

Aggregatbildung des Lantibiotikums Nisin mit Baktoprenolkomponenten der bakteriellen Zellwandbiosynthese

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Katharina Maria Scherer

aus Bonn

Bonn, Februar 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich–Wilhelms–Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck
2. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Georg Sahl

Tag der Promotion: 29.06.2015
Erscheinungsjahr: 2015

Für meine Eltern und meinen Bruder

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1	Einleitung	1
1.1	Biologische und Modellmembranen	1
1.1.1	Aufbau von bakteriellen Membranen	4
1.1.2	Unilamellare Riesenvesikel als Modellsystem	8
1.2	Physikalische Eigenschaften von Lipiddoppelschichten	13
1.2.1	Laterale Diffusion von Membranpartikeln	13
1.2.2	Krümmung und Deformation	16
1.3	Antimikrobielle Peptide	20
1.3.1	Vorkommen und Klassifizierung	20
1.3.2	Wirkmechanismen	22
1.3.3	Strukturelle Faktoren für eine Membranaktivität	25
1.3.4	Membranaktivität von antimikrobiellen Peptiden	27
1.4	Wirkmechanismus des Lantibiotikums Nisin	29
1.5	Motivation und offene Fragestellungen	33
2	Ergebnisse	35
2.1	Einfluss der Fluoreszenzmarkierung auf die Aktivität	36
2.1.1	Nisin	36
2.1.2	Lipid II	37
2.2	Nisinaktion <i>in vivo</i>	38
2.3	Bindung von Nisin an GUV-Membranen	41
2.3.1	Ladungsinduzierte Wechselwirkungen	42
2.3.2	Spezifische Wechselwirkungen	43
2.4	Aggregatbildung zwischen Nisin und Baktoprenolkomponenten	46
2.5	Messung der Lipidmobilität mittels Lichtblattmikroskopie	50

2.6	Die Dynamik des Nisin-Lipid II-Aggregationsprozesses	53
2.6.1	Analyse der mittleren Diffusionskoeffizienten	53
2.6.2	Verteilung der Diffusionskoeffizienten	55
2.6.3	Berechnung repräsentativer Diffusionskoeffizienten	57
2.7	Größenabschätzung der Nisin-Lipid II-Aggregate	61
2.7.1	Berechnung der Membranviskosität und der Lipidradien	61
2.7.2	Berechnung der Aggregatgrößen	63
2.7.3	Abschätzung der Lipid II-Molekülzahl pro Aggregat	64
2.8	Membrankrümmungseffekte durch die Aggregatbildung	66
2.9	Membranpermeation durch Nisin	70
2.9.1	Einfluss der Nisinbindungspartner	70
2.9.2	Einfluss des Nisin-Lipid II-Konzentrationsverhältnisses	73
3	Diskussion	75
3.1	Aggregation in bakteriellen Membranen	75
3.2	Interaktion von Nisin mit Modellmembranen	77
3.3	Analyse der Nisin-Lipid II-Aggregation in Modellmembranen	79
3.4	Membrandeformation durch Nisin	83
3.5	Korrelation von Aggregation und Membranpermeation	85
4	Fazit und Ausblick	89
5	Methoden	91
5.1	Aufreinigung und Markierung von Nisin	91
5.2	Aktivitätsuntersuchung von markiertem Nisin	91
5.3	Präparation von Lipid II und seinen Derivaten	93
5.4	Fluoreszenzmarkierung der Lipide	93
5.4.1	Markierung von Phospholipiden	93
5.4.2	Markierung von Lipid II	94
5.5	Vesikelpräparation	95
5.5.1	Präparation unilamellarer Riesenvesikel	95

5.5.2	Präparation großer, unilamellarer Riesenvesikel	96
5.6	Bakterienkultur für die Mikroskopie	96
5.7	Fluoreszenzspektroskopische Messungen	96
5.8	Mikroskopische Methoden	97
5.8.1	Fluoreszenzmikroskopie von Bakterien	97
5.8.2	Konfokale Laserrastermikroskopie	98
5.8.3	Lichtblattmikroskopie	99
5.9	Datenanalyse	102
5.9.1	Translokationsanalyse	102
5.9.2	Aggregatintensitätsanalyse	102
5.9.3	Kolokalisationsanalyse	103
5.9.4	Trajektorienanalyse	103
5.9.5	Radiusberechnung von membranintegrierten Partikeln	107
5.9.6	Bestimmung der Vesikelgröße	108
5.9.7	Intensitätsanalyse in Bakterien	108
6	Material	109
6.1	Fluoreszenzfarbstoffe	109
6.2	Peptide	109
6.3	Lipide	109
6.4	Chemikalien	110
6.5	Bakterienstämme	111
6.6	Medien	112
6.7	Sonstige Materialien	112
	Literaturverzeichnis	115
	Abbildungsverzeichnis	125
	Tabellenverzeichnis	126
	Tabellenverzeichnis	

Anhang

Danksagung

Zusammenfassung

Wie andere antimikrobielle Peptide besitzt das Lantibiotikum Nisin die Fähigkeit, eine Membran zu perforieren, wenn es in mikromolaren Konzentrationen eingesetzt wird. In Anwesenheit des bakteriellen Zellwandvorläufermoleküls Lipid II sind jedoch schon nanomolare Konzentrationen ausreichend, um eine effektive Membranpermeation zu bewirken. Da die minimale Hemmkonzentration von Nisin ebenfalls in diesem Konzentrationsbereich liegt, wurde lange Zeit angenommen, dass eine durch Bindung an Lipid II induzierte Bildung kleiner Poren der entscheidende Wirkmechanismus von Nisin ist. 2006 wurde jedoch ein alternativer Wirkmechanismus vorgeschlagen, als die Bildung von großen Nisinaggregaten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* entdeckt wurde. Dadurch wird Lipid II vom Ort der Zellteilung entfernt und die Zellwandbiosynthese inhibiert. Es ist unwahrscheinlich, dass diese beiden Wirkmechanismen verschiedene molekulare Ursachen haben. Viel wahrscheinlicher ist es, dass die Fähigkeit zur Nisin-Lipid II Aggregation gleichzeitig die Bildung von Poren verursacht.

Da sich bisherige Studien vor allem auf die Untersuchung des Porenbildungsmechanismus konzentrierten, ist die Fähigkeit zur Bildung von großen Aggregaten ein bisher wenig untersuchter Bestandteil des Wirkmechanismus von Nisin. In dieser Arbeit wurde das Aggregationsverhalten des Lantibiotikums Nisin *in vivo* an Bakterienmembranen und *in vitro* an Modellmembranen analysiert. Die biologische Relevanz der Bildung von großen Nisin-Lipid II-Aggregaten wurde an Zellen von *Bacillus subtilis* untersucht. So wurde festgestellt, dass eine Korrelation zwischen der Aggregatgröße und dem Zelltod besteht. Ab einem Grenzwert war der Zelltod praktisch garantiert. Die Bildung von großen Aggregaten war besonders am Septum und an den Zellpolen zu beobachten, wo die hohe Lipid II-Dichte vermutlich die Aggregation erleichtert.

Der Aggregationsprozess wurde weiter unter kontrollierten Versuchsbedingungen in der Membran von unilamellaren Riesenvesikeln mittels fluoreszenzmikroskopischer Methoden untersucht. Mittels konfokaler Laserrastermikroskopie wurde die Aggregatbildung von fluoreszenzmarkiertem Nisin mit verschiedenen Baktopenolbindungspartnern, die Bestandteil des Zellwandbiosyntheszyklus sind, visualisiert. Quantitative Analyse der Aggregatintensitäten zeigte, dass die Aggregate abhängig vom Bindungspartner unterschiedliche Größen besaßen. Die größten Aggregate entstanden nach Bindung an Lipid I und Lipid II. Es zeigte sich außerdem, dass die Aggregatgröße abhängig von dem Nisin-zu-Lipid II-Konzentrationsverhältnis war.

Mittels Einzelmolekülverfolgung von Lipid II-Atto647-Molekülen nach Zugabe von Nisin wurde der Aggregationsprozess unter Verwendung eines Lichtscheibenmikroskops analysiert. Es wurden abhängig von der Inkubationszeit und dem Nisin-zu-Lipid II-Konzentrationsverhältnis aufgrund der Aggregation unterschiedliche Lipid II-Mobilitäten beobachtet. Durch eine Trajektorienanalyse konnten Diffusionskoeffizienten bestimmt werden, die charakteristisch für unterschiedlich große Lipid II-Spezies waren. Der Zusammenhang zwischen Diffusionskoeffizient und Radius wurde verwendet, um die Größe der unterschiedlichen Lipid II-Aggregate zu ermitteln. Mit einem einfachen, geometrischen Modell konnte die Größenordnung der Lipid II-Zahl in den Aggregaten abgeschätzt werden - 10^2 - 10^3 für kleine Aggregate und 10^5 - 10^6 für große Aggregate. Damit waren die beobachteten Aggregate deutlich größer als die putativen Oligomere aus vier Lipid II und acht Nisinmoleküle in dem 2004 von Hapser und Mitarbeitern beschriebenen Porenmodell.

Die Aggregatgröße wirkte sich entscheidend auf die Permeation und Destabilisierung der Modellmembranen aus. Mit zunehmender Aggregatgröße war eine effektivere Permeation der Riesenvesikel und teilweise eine Vesikelabschnürung bis hin zum Kollaps zu beobachten. Diese in Modellmembranen beobachteten Membraneffekte sind vermutlich für den Wirkmechanismus von Nisin von entscheidender Bedeutung. Zusätzlich zu den Permeationseffekten ist zu erwarten, dass die durch die Aggregation gestörte Lipidordnung in der Membran auch zu Fehlfunktionen der Zellwandbiosynthesemaschinerie führt. Mithilfe

1 Einleitung

1.1 Biologische und Modellmembranen

Die Zellen aller Lebewesen sind von Membranen umgeben. Sie dienen den Zellen vor allem als Schutz, indem sie eine Trennschicht zwischen dem Zellinneren und der Umgebung bilden. Die Membranen bestehen aus Lipiden und Proteinen. Die Lipide bilden das Grundgerüst der Membran, die Lipiddoppelschicht. Sie verleiht der Membran ihre Funktion als passive Trennschicht, da sie nahezu undurchlässig für polare Moleküle wie Wasser und Ionen ist. Durch die Integration von Proteinen in die Lipiddoppelschicht wird die Membran funktionalisiert, sodass überlebenswichtige Prozesse wie der selektive Transport von Molekülen zur Aufnahme von Nährstoffen und zur Entsorgung von Abfallstoffen, die Energiespeicherung und das Übermitteln von Informationen stattfinden können. Außerdem nutzen Zellen Membranen zur Kompartimentierung vieler Prozesse. So besitzen tierische und pflanzliche Zellen durch Membranen abgegrenzte Organellen wie den Zellkern, den Träger des Erbguts, oder Peroxisomen, in denen zelluläre Metabolite abgebaut werden. In Pflanzen- und Pilzzellen und sogar in einigen Bakterienstämmen findet man Vakuolen, die vor allem eine Speicherfunktion sowohl von Nähr- als auch von Abfallstoffen innehaben.

Lipide sind amphiphile Moleküle, d. h. sie besitzen sowohl hydrophile als auch hydrophobe strukturelle Merkmale. Deshalb können sie in wässriger Umgebung als Folge des hydrophoben Effekts eine Doppelschicht ausbilden. Dabei befinden sich die hydrophoben Ketten der Lipide im Inneren der Schicht und die hydrophilen Kopfgruppen an der Grenzfläche zu der wässrigen Umgebung (Abbildung 1.1). Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Membran wie Fluidität und Elastizität (Abschnitte 1.2.1 und 1.2.2) können durch die Lipidzusammensetzung beeinflusst werden. Die am häufigsten vorkommenden Lipide sowohl in tierischen als auch in bakteriellen Zellen sind Phospholipide. Phospholipide besitzen zwei (oder bei Cardiolipin vier) hydrophobe Kohlenstoffketten, eine Verbindungsstruktur z. B. Glycerin und eine hydrophile Kopfgruppe, die eine unterschiedlich funktionalisierte Phosphatgruppe enthält. Phospholipide können durch folgende Strukturmerkmale genauer charakterisiert werden: die Kettenlänge, die Anzahl der Doppelbindungen und die Polarität der Kopfgruppe.

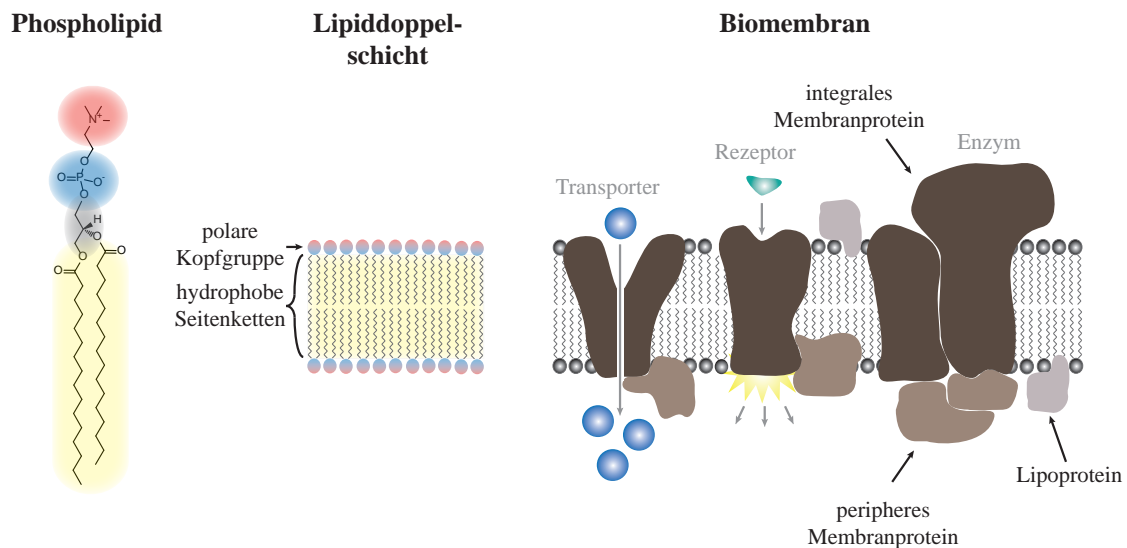


Abbildung 1.1: Links ist exemplarisch die Struktur des Phospholipids Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) gezeigt. Phospholipide bestehen aus zwei Hauptelementen: der polaren Kopfgruppe und den hydrophoben Seitenketten. Die Kopfgruppe ist über ein Glycerinmolekül (grau) mit den Seitenketten (gelb), den Fettsäuren, verbunden. Die Kopfgruppe besteht aus einem negativ geladenen Phosphat (blau) und einer daran gekoppelten funktionellen Gruppe (rot), hier ein positiv geladenes Cholin. Daneben ist schematisch die Lipiddoppelschicht dargestellt, in der sich die Seitenketten nach innen und die Kopfgruppen an die Wassergrenzfläche orientieren. Die Darstellung rechts zeigt eine Biomembran, bestehend aus der Lipiddoppelschicht und einer hohen Dichte an Membranproteinen. Es sind integrale, periphere und Lipoproteine mit verschiedenen Funktionen dargestellt.

Eingebettet in die Lipidmatrix sind Membranproteine. Membranproteine können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden: integrale Proteine, periphere Proteine und Lipoproteine (Abbildung 1.1). Integrale Proteine sind wie Lipide amphiphil. Ihre hydrophoben Domänen sind in die Membran eingebettet und ihre Ektodomänen ragen aus der Membran heraus. Sie überspannen die gesamte Membran und dienen der Zelle als Transporter, Kanäle und Rezeptoren sowie zur Membranverankerung. Periphere Proteine sind wasserlöslich und lagern sich durch eine Mischung aus elektrostatischen, hydrophoben und anderen nicht-kovalenten Wechselwirkungen temporär und reversibel an die Lipiddoppelschicht oder an integrale Proteine an. Die Bindung kann zu einer Konformationsänderung und Reorganisation der Bindungspartner führen und auch die Assoziation bzw. Dissoziation umgebender Lipid- und Proteinkomponenten beeinflussen [1]. Diese Mechanismen werden z. B. zur Regulation von vielen Ionenkanälen und Transmembranrezeptoren genutzt [2]. Lipoproteine sind über eine kovalent gebundene Lipidkette in der Membran verankert. Es wird vermutet, dass die Lipidkette dafür sorgt, dass sich das Protein in die Umgebung gleichkettiger Lipidmoleküle einfügen kann [3].

Als Antwort auf die Frage der Organisation von Lipiden und Proteinen innerhalb biologischer Membranen entwickelten Singer und Nicholson 1972 das Flüssig-Mosaik-Modell

auf Grundlage der dynamischen Eigenschaften der Proteine in der Membran [4]. Darin wird die Membran als zweidimensionale, homogene Lösung aus Lipiden und Proteinen beschrieben, wobei die Lipidkomponente dem Lösungsmittel entspricht, in dem die Proteine frei diffundieren können. Die dynamischen Eigenschaften der Membran sind zweifelsfrei von grundlegender Bedeutung für die Funktionalität der Zelle. So können z. B. Phagozytose und Zellsignalübertragung durch die Fluidität der Membran reguliert werden [5]. Trotzdem gab es seit der Veröffentlichung des Modells viele Beobachtungen, die gegen das vereinfachte Modell einer zufälligen Verteilung der Lipid- und Proteinkomponenten in der Membranschicht sprechen.

Zunächst ist der Massenanteil der Proteine mit im Durchschnitt 50 % sehr hoch, wodurch häufig Wechselwirkungen zwischen den Proteinen durch Crowding, Kollisionen der Ekto-domänen und spezifische Protein-Protein- und Protein-Lipid-Bindungen entstehen. Zusammen verursachen sie eine Vielzahl an Restriktionen der Lipid- und Proteinmobilität, die in Einzelmolekülverfolgungsexperimenten messbar sind. So konnte eine komplexe, laterale Proteinmobilität aufgezeigt werden, die von einer gerichteten bis zu einer eingeschränkten Bewegung sowie anormaler als auch freier Diffusion reichten [6, 7].

Zudem sind viele Protein-Protein-Wechselwirkungen, die im Flüssig-Mosaik-Modell ignoriert werden, nicht zufällig, sondern spielen für die Zelle eine entscheidende funktionelle Rolle. Da zelluläre Prozesse davon abhängig sind, wann und wo Enzyme aktiv werden, gibt es ausgeklügelte, molekulare Mechanismen, die ihre räumliche und zeitliche Organisation regulieren. Ein Beispiel für einen solchen Prozess ist die Zellteilung von *Escherichia coli* Bakterien, bei der ein Proteinsystem, bestehend aus drei Proteinen, die Positionierung und den Aufbau der Ringstruktur organisiert, an der die Zellteilung stattfindet [8]. Aber auch spezifische Protein-Lipid-Wechselwirkungen sind für viele Prozesse notwendig. Lipide sind oft Bestandteil von Proteinkomplexen und können dadurch z. B. die Positionierung der Membranproteine in der Membran bestimmen und die Faltung und Aktivität von integralen Membranproteinen beeinflussen [9].

Innerhalb der Biomembran besteht also eine große laterale Heterogenität. Trotz dieser funktionell benötigten Segregation der Proteine muss diese lokal genug sein, damit die Fluidität der Membran nicht verloren geht. Im Konzept der sogenannten „lipid rafts“ die heterogene Organisation der Membran berücksichtigt. „Lipid rafts“ sind Mikrodomänen, die mit verschiedenen Lipiden und Proteinen angereichert sind. Mittels mikroskopischer Untersuchungen wurde die Existenz von „lipid rafts“ *in vivo* nachgewiesen [10, 11]. Die Größe der „lipid rafts“ liegt im Bereich von 10-200 nm [12]. In eukaryotischen Zellen sind häufig Membranproteine, die Funktionen als Transport- oder Signalproteine haben, in mit Cholesterin und Sphingolipiden angereicherten „lipid rafts“ zu finden [10, 12, 11]. „Lipid rafts“ wurden auch in Bakterien beobachtet, wo ihr Verlust die Biofilmbildung und Proteinsekretion beeinträchtigte [13].

1.1.1 Aufbau von bakteriellen Membranen

Bakterielle Membranen unterscheiden sich in ihrer Lipidzusammensetzung (Tabelle 1.1) grundsätzlich von tierischen Zellmembranen. Letztere enthalten durchschnittlich 50 Massenprozent Cholesterin [14], das ist ein Steroid bestehend aus einer polaren Hydroxidgruppe und einem hydrophoben polyzyklischen Grundgerüst mit einer kurzen Kohlenwasserstoffkette. Es erhöht die Membrankohäsion und mechanische Steifigkeit der Membran [15, 16] und ist nicht in Bakterien zu finden. Des Weiteren enthalten nach aktuellen Studien nur etwa 10 % der Bakterien überhaupt Phosphocholin (PC) [17], welches in tierischen Zellen das am häufigsten vorkommende Phospholipid ist. Außerdem besitzen bakterielle gegenüber tierischen Plasmamembranen einen hohen Anteil an negativ geladenen Lipiden, nämlich Phosphatylglycerin (PG) und Cardiolipin. Bakterien sind oft abrupten Änderungen der Temperatur, Osmolarität oder des pH-Wertes in ihrer extrazellulären Umgebung ausgesetzt. Bakterien können ihre Lipidzusammensetzung adaptieren, um sich an die jeweiligen Bedingungen anzupassen. Die Membranpermeabilität können sie regulieren, indem sie durch Modifikation oder Neubildung von Seitenketten die Viskosität anpassen. Auch pathogene Bakterien ändern ihre Lipidstrukturen, um z. B. ihre Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen zu erhöhen [18].

	PC	PE	PG	CL	Sonstige
Tierische Plasmamembran [14]	40	25	-	-	35
Gram-negative Bakterien					
<i>E. coli</i> [19]	-	80	15	-	5
Gram-positive Bakterien					
<i>B. subtilis</i> [20]	-	30	36	12	22
<i>S. aureus</i> [21]	-	-	58	42	-

Tabelle 1.1: Phospholipidzusammensetzung verschiedener Zellmembranen. Werte sind für die Lipide Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerin (PG) und Cardiolipin (CL) als Massenprozent des gesamten Phospholipidgehalts angegeben.

Im Gegensatz zu tierischen Zellen bedarf die Zellmembran der Bakterien einer zusätzlichen, extrazellulären Schicht, der Zellwand, die ihnen strukturelle Integrität bietet und die Membran vor dem Turgordruck, der durch die hohe Protein- und Metabolitkonzentration im Inneren der Zelle entsteht, schützt [22]. Die Zellwand unterscheidet sich im Aufbau für Gram-positive und Gram-negative Bakterien (Abbildung 1.2).

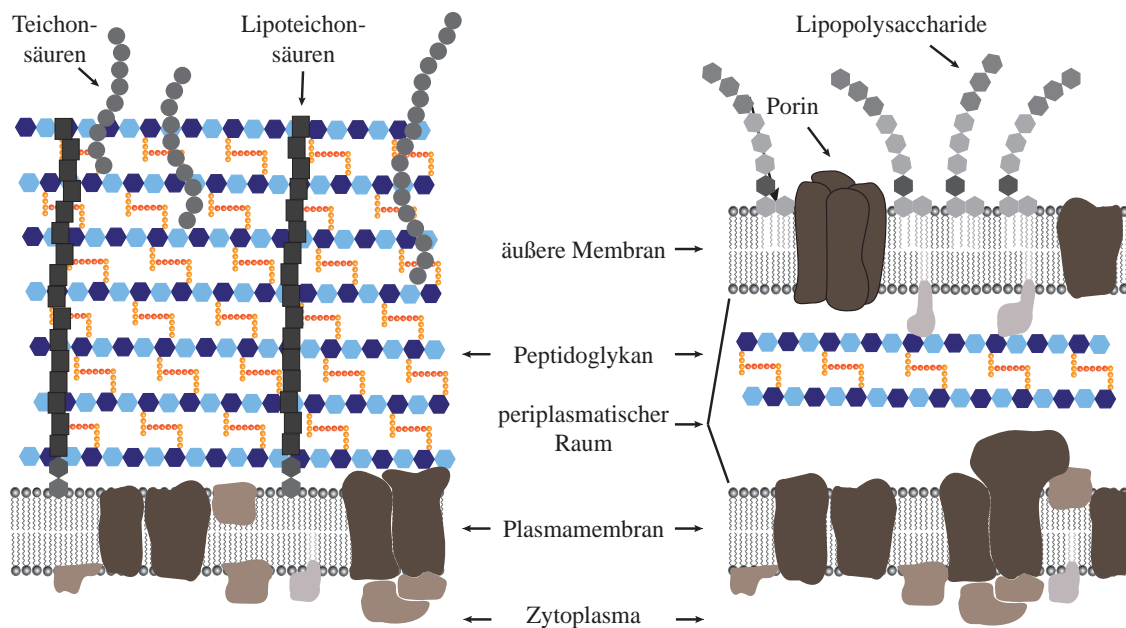


Abbildung 1.2: Schema der Zellmembran und Zellwand von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien basierend auf [22]. Gram-positive Bakterien besitzen zum Schutz ihrer Zellmembran eine dicke Polymerschicht, das Peptidoglykan. In diesem Netzwerk befinden sich Lipoteichonsäuren, die in der Membran verankert sind, und negativ geladene Teichonsäuren, die an die Oberfläche der Bakterien ragen. Gram-negative Bakterien besitzen zusätzlich zur Zellmembran eine zweite, die äußere, Membran. Zwischen den Membranen, im periplasmatischen Raum, befindet sich eine weitaus dünnere Peptidoglykanschicht als bei Gram-negativen Bakterien. In der äußeren Membran finden sich viele Proteinkanäle, die Porine. Auf der Innenseite dieser Membran gibt es Lipoproteine, die die Membran an der Peptidoglykanschicht befestigen. Die äußere Schicht besteht hauptsächlich aus negativ geladenen Lipopolysacchariden.

Gram-positive Bakterien wie *Bacillus subtilis* oder *Staphylococcus aureus* besitzen eine Zellwand aus einem Peptidoglykannetzwerk mit einer Dicke von 30-100 nm [22]. Diese Schicht ist mit weiteren Zuckerpolymeren angereichert, den Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren. Teichonsäuren spielen eine entscheidende Rolle für die Bewahrung der Zellform, die Regulation der Zellteilung und andere Aspekte der Zellphysiologie. Sie sind außerdem wichtig für die Resistenz gegen Antibiotika [23]. Die genaue Funktion von Lipoteichonsäuren ist noch nicht bekannt, allerdings zeigen defiziente Mutanten bedeutende Defekte in Wachstum und Physiologie [24]. Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* besitzen dagegen eine wesentlich dünnere Peptidoglykanschicht von nur wenigen Nanometern Dicke [22], die aber

noch von einer zweiten, der äußeren, Membran umschlossen ist. Die Außenseite dieser Membran enthält hauptsächlich Lipopolysaccharide. Sowohl die Oberfläche von Gram-negativen als auch von Gram-positiven Bakterien besitzt eine negative Gesamtladung, die durch die negativ geladenen Teichonsäuren und Lipopolysaccharide an der Bakterienoberfläche hervorgerufen wird.

Die Biosynthese der Zellwand ist ein sehr komplexer, dynamischer und hoch regulierter Prozess. Die Reaktion ist entscheidend für eine ordnungsgemäße und koordinierte Fortsetzung des Zellzyklus und erfordert die lokalisierte Selbstorganisation von Multiproteinkomplexen an der Zellmembran. Damit dient die Membran nicht nur der Separation und dem Schutz der Zelle, sondern auch als Reaktionsoberfläche [22]. Die Zellwandbiosynthese ist schematisch in Abbildung 1.3 gezeigt. Das lösliche Vorläufermolekül der Peptidoglykaneinheit, UDP-*N*-Acetylmuraminsäure-Pentapeptid (UDP-MurNAc), wird durch die sequentielle Reaktion der MurA bis MurF Enzyme hergestellt. An der Membran wird UDP-MurNAc durch MraY auf den Lipidanker Baktoprenolphosphat (C_{55} -P) übertragen, sodass Lipid I entsteht. MurG koppelt daraufhin UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) an die Kopfgruppe von Lipid I, wodurch Lipid II entsteht. In *Staphylococcus aureus* wird Lipid II weiter modifiziert, indem fünf Glycinmoleküle durch Katalyse der FemXAB Enzyme an die Lysin-Gruppe des Lipid II-Moleküls gekoppelt werden. Diese Interpeptidbrücken kommen in den meisten Gram-positiven Bakterien vor, können aber in Länge und Zusammensetzung variieren. Schließlich wird Lipid II durch einen unbekannten Mechanismus über die Membran auf die extrazelluläre Seite transportiert. Es gibt aber Hinweise, dass das essentielle Zellteilungsprotein FtsW [25] den Transport katalysiert. Auf der äußeren Seite der Membran wird der Einbau der Peptidoglykaneinheiten durch Penicillin-bindende Proteine (PBPs) mittels Transglykosidierungs- und Transpeptidierungsreaktionen kontrolliert. Der verbleibende Lipidanker C_{55} -PP wird zu dem Monophosphat C_{55} -P dephosphoryliert und zurück auf die zytosolische Seite der Membran transportiert, um dort einen neuen Syntheseyklus zu starten.

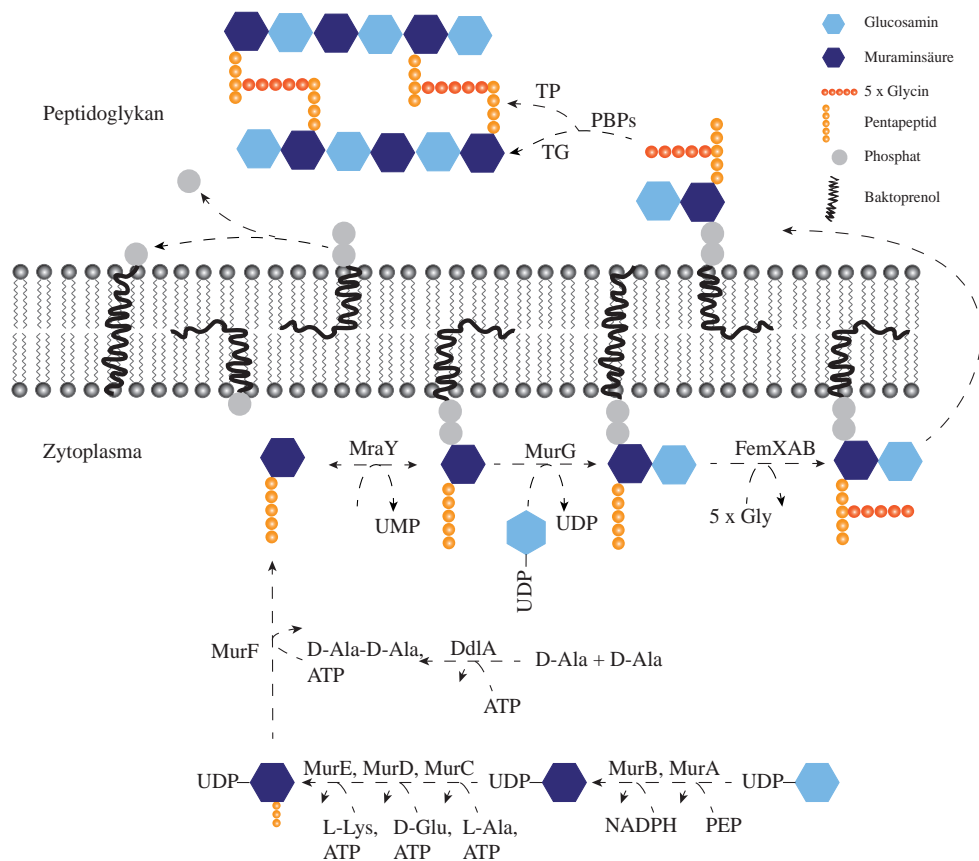


Abbildung 1.3: Schema des Zellwandbiosynthesezyklus in *S. aureus*. Modifiziert nach [26]. Im Zytoplasma wird zunächst Uridindiphosphat (UDP)-N-Acetylglucosamin in mehreren Schritten, die durch die Enzyme MurA-MurF und einer D-Alanyl-D-alanyl-Ligase katalysiert werden, zu UDP-N-Acetylmuraminsäurepentapeptid umgewandelt. Dieses wird in membranassoziierten Reaktionen zunächst durch Kopplung an Baktoprenol zu Lipid I und dann weiter zu Lipid II umgewandelt. Im Fall von *S. aureus* wird durch FemABX Enzyme ein Pentapeptid aus Glycinmolekülen an die Lysingruppe des Lipid II-Moleküls gekoppelt. Die Translokation von Lipid II durch die Membran erfolgt durch einen Mechanismus, der noch nicht vollständig aufgeklärt ist, an dem aber das integrale Membranprotein FtsW, ein essentielles Zellteilungsprotein, beteiligt ist [25]. Auf der Außenseite der Bakterienmembran wird die Peptidoglykaneinheit von Penicillin-Bindeproteinen durch Transglykosidierung und Transpeptidierung in das Peptidoglykannetzwerk eingebaut. Das zurückbleibende Trägerlipid, C₅₅-PP, wird zum Monophosphat, C₅₅-P, dephosphoryliert und wieder auf die zytosolische Seite transportiert, um einen neuen Synthesezyklus zu starten.

1.1.2 Unilamellare Riesenvesikel als Modellsystem

Da natürliche Biomembranen eine fundamentale Rolle für die Funktionalität von Zellen haben, aber gleichzeitig sehr komplex sind, wurden verschiedenste Modellsysteme entwickelt. Durch solche Modellsysteme ist es möglich, die Rolle individueller Komponenten gezielt zu untersuchen und die Organisation und Dynamik eines solchen Systems unter definierten Bedingungen zu analysieren. Die meisten Systeme beruhen auf der Präparation einer Lipiddoppelschicht und, je nach Experiment, anschließender Rekonstitution einzelner Proteinspezies. Meist wird eine im Vergleich zu Biomembranen weniger komplexe Lipidmischung verwendet. Es können aber auch für die Präparation von Modellmembranen Fragmente aus Zellmembranen verwendet werden [27].

Lipiddoppelschichten als vereinfachtes Modell einer biologischen Membran lassen sich relativ leicht und kontrolliert präparieren. Besonders häufig werden Vesikel verwendet, deren Durchmesser von $\approx 15\text{-}20\text{ nm}$ (sehr kleine unilamellare Vesikel, very small unilamellar vesicles, VSUVs [28]) bis zu $10\text{-}100\text{ }\mu\text{m}$ (unilamellare Riesenvesikel, giant unilamellar vesicles, GUVs [29]) reichen können. Andere Modellsysteme sind planare Lipiddoppelschichten, die auf diversen Substraten wie Glas, Gold oder polymerbeschichteten Oberflächen [30, 31] verankert werden können, und sogenannte Bizellen [32], typischerweise bestehend aus zwei Lipidspezies, von denen die eine die flache Lipiddoppelschicht und die andere eine mizellenartige Begrenzung bildet (Abbildung 1.4 A).

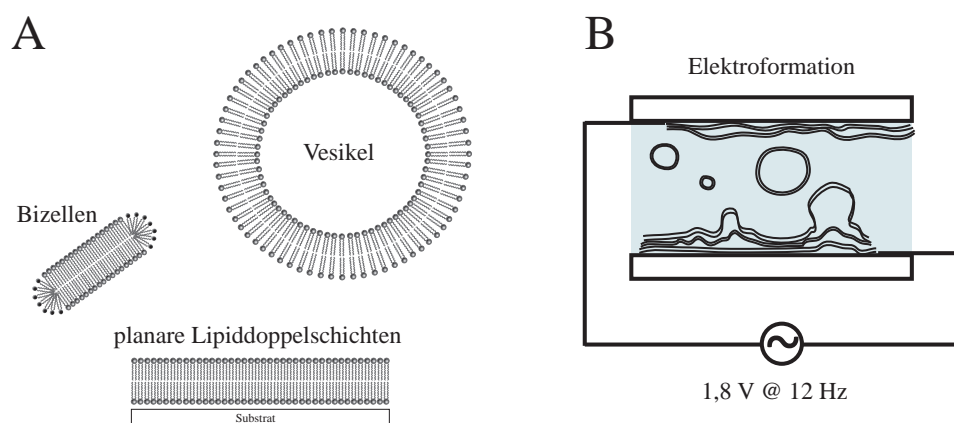


Abbildung 1.4: In (A) sind schematisch verschiedene Modellmembransysteme gezeigt: Vesikel, planare Lipiddoppelschichten und Bizellen. (B) stellt schematisch die Elektroformation zur Präparation von Riesenvesikeln dar. Durch Anlegen einer Wechselspannung wird der Lipidfilm in Schwingungen versetzt, bis sich die Vesikel von dem halbleiterbeschichteten Deckglas ablösen.

GUVs eignen sich aus verschiedenen Gründen besonders gut als Modellsystem. Ein Vorteil dieses Modellsystems liegt darin, dass im Gegensatz zu planaren Lipiddoppelschichten freistehende Membranen untersucht werden können, deren Eigenschaften nicht durch

ein Substrat beeinflusst werden. So konnten physikochemische wie z. B. strukturelle, mechanische und elastische Eigenschaften der Lipiddoppelschicht charakterisiert werden. Ein weiterer, wesentlicher Vorteil besteht in ihrer Größe. Dadurch ist es problemlos möglich, einzelne Vesikel zu analysieren und damit eine Heterogenität in Form, Größe und Multilamellarität, wie sie in Ensemblemessungen vorkommt, auszuschließen. Außerdem sind die Dimensionen der GUVs deutlich größer als das intrinsische Auflösungsvermögen der optischen Mikroskopie (lateral ca. 250 nm im Bereich des sichtbaren Lichts), so dass diverse Methoden der Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung der strukturellen und dynamischen Eigenschaften eingesetzt werden konnten. Größe und Topologie der GUVs eröffnen zudem Möglichkeiten für die synthetische Biologie, um systematisch eine „minimale“ Zelle zu konstruieren [33].

Zur Präparation der GUVs werden vorwiegend zwei verschiedene Methoden verwendet: die Hydratation [34] und die Elektroformation [29] von Lipidfilmen. Bei der Hydratation wird ein getrockneter Lipidfilm für längere Zeit (bis zu 24 Stunden) einer elektrolytfreien, wässrigen Lösung bei Temperaturen über der Phasenübergangstemperatur ausgesetzt. Die Präparation mittels Elektroformation hat den Vorteil, dass die Größenverteilung der GUVs (5-100 μm im Durchmesser) homogener ist als bei der Hydratation [35]. Es wird dafür allerdings die Konstruktion einer speziellen Kammer, die aus zwei Elektroden und einem Spannungsgenerator besteht, benötigt. In dieser Arbeit wurde die Methode der Elektroformation zur GUV-Präparation gewählt. Als Elektroden wurden mit dem Halbleitermaterial Indiumzinnoxid (indium tin oxide, ITO) beschichtete Deckgläser eingesetzt (Abbildung 1.4 B); oft werden aber auch Platindrähte gebraucht. Das Schwellen eines Lipidfilms und die dadurch hervorgerufene Vesikelbildung wird bei der Elektroformation durch ein elektrisches Wechselfeld mit geringer Spannung und niedriger Frequenz induziert [29]. Der Durchmesser der entstehenden GUVs hängt stark von der verwendeten Lipidmischung, dem Medium und den Wechselfeldparametern ab. Die Wechselfeldparameter bestimmen die Amplitude der elektroosmotischen Vibrationen und damit auch die Membranspannung der GUVs bei ihrer Bildung [36].

Der Mechanismus der Elektroformation ist noch nicht vollständig verstanden, aber verschiedene Effekte des äußeren elektrischen Felds auf das Schwellen des Lipidfilms und die Bildung der Vesikel wurden vermutet. Die periodische, elektroosmotische Bewegung des wässrigen Mediums an der Wasser-Elektroden-Grenzfläche verursacht Schwingungen senkrecht zu der Elektrodenoberfläche, auf der sich der Lipidfilm befindet. Diese Schwingungen ziehen Lipidlamellen von der Elektrode, was ihr Wachstum und eine Separation der Lipidschichten bewirkt. Verstärkt durch die elektroosmotischen Schwingungen kommt es zu einer Fusion von kleinen, benachbarten Vesikeln zu größeren Vesikeln [37]. Die sphärischen, großen Vesikel lösen sich dann nach einigen Minuten bis zu mehreren Stunden von der Oberfläche und diffundieren in die Lösung.

Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die Ausbeute und Größe der GUVs mit zunehmender Salzkonzentration in der wässrigen Lösung stark sinkt [35]. Ebenso sind GUVs aus zylinderförmigen, neutralen Phospholipiden (PC) stabiler als aus kegelförmigen (PE) oder negativ geladenen (PG oder PS) Phospholipiden. Diese Lipide können nur bis zu einem bestimmten Anteil eingebaut werden [38]. Die Effizienz der Vesikelbildung kann dagegen durch die Zugabe von Zuckern wie z. B. Saccharose oder Glucose gesteigert werden [39].

Mittlerweile existieren relativ viele Methoden, um Proteine in GUV-Membranen zu rekonstituieren. Eine präparativ einfache und die für die Funktionalität der Proteine schonendste Methode ist die Herstellung von GUVs durch Elektroformation in Gegenwart von Detergenzien. Die detergentienhaltige GUV-Membran ist durchlässig für Salze und ermöglicht die Einstellung von physiologischen Pufferbedingungen. Die in Detergenzmizellen aufgereinigten Proteine können direkt in die Membran rekonstituiert und die Detergenzien anschließend aus der Membran entfernt werden [40]. Alternativ können durch Behandlung mit polaren organischen Lösungsmitteln aus der Plasmamembran von Zellen Riesenvesikel geformt werden [41].

Die Anwendungen für GUVs sind äußerst vielfältig und sehr häufig werden mikroskopische Methoden eingesetzt (Abbildung 1.5). Zunächst wurden in den 80er Jahren mikromechanische Methoden verwendet, um durch gezielte Deformation die Elastizität und den Reißwiderstand in Abhängigkeit der Lipidzusammensetzung zu messen [42]. Ende der 90er Jahre wurden dann fluoreszenzmikroskopische und -spektroskopische Methoden eingesetzt, um die laterale Struktur der Membran zu beobachten. Die Stärke dieser Methoden liegt in ihrer Sensitivität und der Verfügbarkeit orts aufgelöster Informationen über die Umgebung der membranintegrierten Fluoreszenzmarker. Dabei wurden je nach Anwendung verschiedene Arten von Fluoreszenzfarbstoffen eingesetzt. Zu einer Gruppe gehören amphiphile Derivate von Rhodaminen, Fluoresceinen und Dialkylcarbocyanen (DiD, DiI, DiO), die sich in bestimmte Regionen der Membran einordnen. Diese wurden als Indikator verwendet, um Lipidphasen in GUVs bei verschiedenen Temperaturen und Lipidzusammensetzungen abzubilden und Phasendiagramme zu erstellen [43]. Eine zweite Gruppe an Fluoreszenzmarkern zeigt eine Änderung ihrer spektroskopischen Eigenschaften wie der Lebenszeit oder des Emissionsmaximums in Abhängigkeit ihrer molekularen Umgebung. Diese Information kann ebenfalls zur Untersuchung von Lipiddomänen eingesetzt werden [44]. Eine dritte Gruppe von Fluoreszenzmarkern wird besonders für Einzelmolekülsensitive Methoden gebraucht, für die eine hohe Photostabilität und Helligkeit der Farbstoffe wichtig ist. Farbstoffe, die diese Anforderungen erfüllen, sind meistens relativ groß (> 1 kDa) und werden deshalb über das primäre Amin an die Kopfgruppe von Phosphoethanol (PE)-Lipiden gekoppelt. Mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie oder Einzelmolekülverfolgung kann z. B. die Diffusion dieser Marker analysiert werden, was damit Schlüsse über die laterale Packung in einer bestimmten Membranregion zulässt [45, 46].

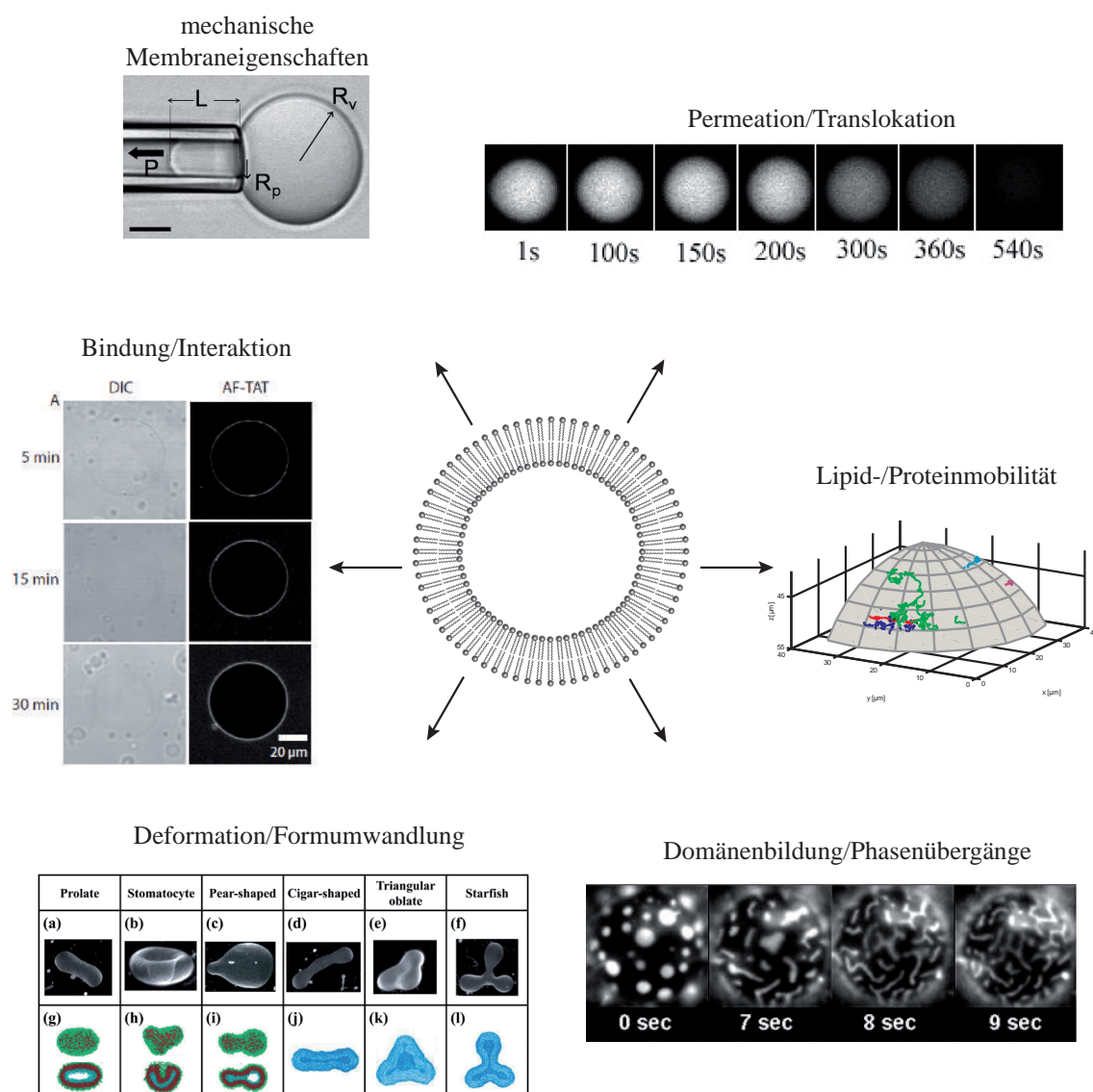


Abbildung 1.5: Experimentelle Verwendung von GUVs zur Untersuchung von Membraneigenschaften und -interaktionen. Die Abbildungen zeigen im Uhrzeigersinn links oben startend: die Analyse von mechanischen Membraneigenschaften [47], die passive Diffusion von Polymeren aus den Vesikeln [48], die Messung von Lipidmobilitäten durch Einzelmolekülverfolgung [38], die Domänenbildung in ternären Lipidmischungen [43], die Beobachtung spontaner Formumwandlungen [49] und die zeitabhängige Bindung des zellpenetrierenden Tat-Peptids [38].

GUVs werden außerdem verwendet, um spezifisch und systematisch Interaktionen zwischen der Lipidmembran und DNA, (antimikrobiellen) Peptiden und Proteinen zu beobachten, wobei sowohl die Membran als auch die adsorbierten Moleküle fluoreszenzmarkiert werden können. Aufgrund ihrer Größe ist es auch möglich, mittels eines optischen Schnitts durch den Äquator der Vesikel die Translokation von fluoreszenzmarkierten Molekülen über die Membran zu verfolgen. Dieses Prinzip wurde genutzt, um die passive Diffusion von Polymeren aus den GUVs [50] zu untersuchen und die Permeabilisierungsmechanismen von membranaktiven Peptiden [51, 52] aufzuklären.

1.2 Physikalische Eigenschaften von Lipiddoppelschichten

1.2.1 Laterale Diffusion von Membranpartikeln

Lipiddoppelschichten sind hochdynamisch. So finden auf verschiedenen Zeit- und Längenskalen Prozesse wie Molekülschwingungen, *gauche-trans* Isomerisierungen der Lipidketten, Rotations- und laterale Diffusion sowie transversale Bewegungen der Lipide und Undulationen der Membran statt (Abbildung 1.6). Innerhalb der Lipiddoppelschicht herrschen drei Diffusionsmodi vor: Rotation sowie transversale und laterale Diffusion. Bei der Rotationsbewegung drehen sich die Lipide um ihre Achse, wodurch ihre Interaktion mit den nächsten Nachbarn beeinflusst wird, sich ihre Position in der Membran aber nicht ändert. Als transversale Diffusion, auch „flip-flop“ genannt, wird der Austausch von Lipidmolekülen zwischen den beiden Schichten der Modellmembran bezeichnet. Laterale Diffusion entsteht, wenn die Lipide aufgrund der Brownschen Molekularbewegung die Plätze mit ihren Nachbarn tauschen und sich auf diese Art durch die Doppelschicht bewegen.

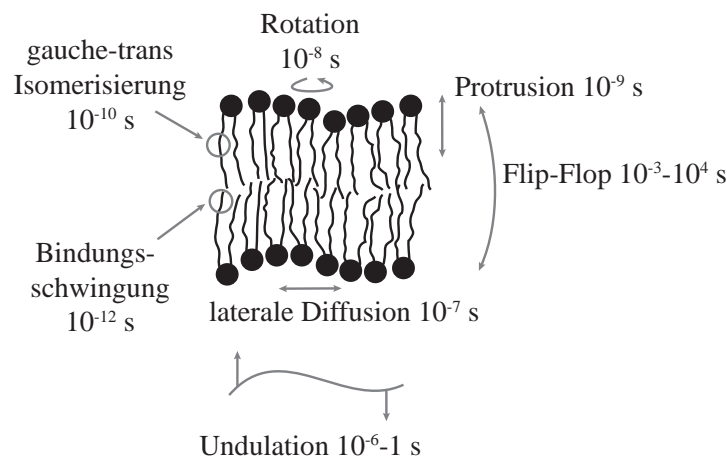


Abbildung 1.6: Dynamische Prozesse in der Lipiddoppelschicht. Auf verschiedenen Zeitskalen finden unterschiedliche Bewegungen statt: molekulare Bewegungen (Molekülschwingungen, *gauche-trans* Isomerisierungen), Bewegungen der Lipide (Rotation, laterale Diffusion, „flip-flop“) und der Lipiddoppelschicht (Undulationen, Protusionen). Abbildung übernommen aus [53].

Mehrere Faktoren beeinflussen die Lipiddynamik: Hydratation, Temperatur und Druck sowie die Struktur der beteiligten Lipidspezies. Davon abhängig können Lipide in der Lipiddoppelschicht in verschiedenen Phasen vorliegen. Besonders deutlich wird der Einfluss des Phasenverhaltens auf die Lipidmobilität am Beispiel der Änderung der lateralen Diffusion beim Übergang von der Gelphase zur flüssigen Phase. In der Gelphase sind die Lipide nahezu immobil, während in der flüssigen Phase die thermische Energie genügt, damit die Lipide sehr schnell ($\approx 10^{-7}$ s) ihre Plätze mit den Nachbarn tauschen und auf einem „random walk“ durch die Membran diffundieren.

Jede Lipidspezies besitzt eine spezifische Phasenübergangstemperatur. Diese wird vor allem durch Van-der-Waals Kräfte zwischen den Molekülen bestimmt. Dabei spielen sowohl die Länge der Lipide als auch ihre Konformation eine Rolle. Je länger die hydrophobe Alkylkette der Lipide ist, desto größer sind die attraktiven Van-der-Waals Kräfte aufgrund der größeren Interaktionsfläche. Enthalten die Ketten dagegen eine oder mehrere Doppelbindungen, führt das zu einem Knick in der Kette, so dass die Ordnung der Lipidpackung gestört wird. Dadurch entsteht freier Raum, wodurch die benachbarten Ketten über zusätzliche Flexibilität verfügen.

Die laterale Diffusion von Lipiden sowie integralen und peripheren Membranproteinen ist in Zellmembranen ein wichtiger Faktor, um funktionale Prozesse zu kontrollieren [54, 55]. Es gibt verschiedene theoretische Modelle, um laterale Diffusionsprozesse in Membranen zu beschreiben.

Auf Grundlage der Theorie des freien Volumens [56, 57] wurde die Theorie der freien Fläche für zweidimensionale Systeme [58, 59, 60, 61] entwickelt. Mittels dieser Theorie lässt sich die Lipiddiffusion in flüssig-kristallinen Lipiddoppelschichten quantitativ beschreiben. Sie besagt, dass ein Partikel gleicher Größe wie die umgebenden Moleküle nur dann in einer Schicht diffundieren kann, wenn eine Fläche, die größer ist als ein kritischer Wert, neben ihm frei wird. Freie Flächen, die kleiner als der kritische Wert sind, tragen nicht zur Diffusion bei und das Problem wird darauf reduziert, den Beitrag des Systems zur freien Fläche zu bestimmen. Als Lösung dieses Problems ergibt sich für den Diffusionskoeffizienten:

$$D = D' \cdot \exp \left(-\frac{\gamma a^*}{a_f} - \frac{E_a}{k_B T} \right) \quad (1.1)$$

mit dem präexponentiellen Faktor D' , der von der gaskinetischen Geschwindigkeit abhängt und unterschiedlich definiert werden kann [56, 59, 60, 61], dem geometrischen Faktor γ , der den Überlapp der freien Flächen korrigiert, der kritischen Fläche a^* , der mittleren, freien Fläche a_f , der Aktivierungsenergie E_a , der Boltzmann-Konstante k_B und der Temperatur T . Die Aktivierungsenergie hängt für eine Lipiddoppelschicht von der Wechselwirkung der Lipidmoleküle mit ihren Nachbarn, der Wechselwirkung mit der angrenzenden Flüssigkeit und der Energie ab, die benötigt wird, um eine Lücke neben dem diffundierenden Partikel zu erzeugen [61].

Die Diffusion von Membranpartikeln innerhalb einer Lipiddoppelschicht lässt sich auch mit hydrodynamischen Theorien beschreiben. Diese Theorien lassen sich im Gegensatz zur Theorie der freien Fläche auch auf größere Partikel wie Membranproteine anwenden. Hier wird die Begrenztheit der molekularen Lipidstruktur ignoriert und die Lipiddoppelschicht als zweidimensionales Kontinuum angesehen. Das erste Modell dieser Art wurde von Saffman und Delbrück entwickelt [62]. Es gibt eine genäherte Lösung des hydrodynamischen Problems der laterale Bewegung eines zylinderförmigen Membranpartikels an, wenn die

Membranschicht auf beiden Seiten von einer viskosen Flüssigkeit umgeben ist. Unter der Bedingung, dass die Membranviskosität sehr viel höher als die Viskosität der Umgebung ist, sagt dieses Modell eine logarithmische Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von der Partikelgröße voraus (Abbildung 1.7):

$$D = \frac{k_B T}{4\pi\mu_m h} \cdot \ln \left(\frac{\mu_m h}{\mu_w R} - \gamma \right) \quad (1.2)$$

mit der Membrandicke h , der Membranviskosität μ_m , der Viskosität der umgebenden Flüssigkeit μ_w , dem Partikelradius R und Eulerkonstante $\gamma = 0,577215$. Allerdings ist die Gültigkeit dieses Modells auf einen bestimmten Größenbereich der Membranpartikel begrenzt (Abbildung 1.7). Es gilt nur für Membranpartikel, die klein gegenüber der charakteristischen Längenskala $l = \frac{h\mu_m}{\mu_w}$ [63] sind, die typischerweise im Bereich von 500 nm liegt. Trotzdem findet das Modell bis heute bei sehr vielen Membranstudien seine Anwendung und wurde durch einige *in vitro* Experimente, in denen die Diffusion von Transmembranproteinen gemessen wurde, bestätigt [64].

Allerdings verliert das Modell seine Gültigkeit, wenn die diffundierenden Objekte deutlich größer als Membranproteine sind. Aufgrund ihrer Ausdehnung konnten sowohl experimentelle [65] als auch simulierte [66] Daten der Diffusion von Membrandomänen nicht mit dem Saffman-Delbrück-Modell beschrieben werden. Ein Modell, das die Diffusion von Partikeln beliebiger Radien und Viskositäten (sowohl der Membran als auch der umgebenden Flüssigkeit) beschreibt, wurde von Hughes, Pailthorpe und White entwickelt [63] (Abbildung 1.7). Seine praktische Anwendung wurde allerdings durch komplizierte, numerische Berechnungen verhindert. Petrov und Schwille entwickelten als Lösung dieses Problems einen analytischen Ausdruck [67]:

$$D = \frac{k_B T}{4\pi\mu_m h} \cdot \frac{\left[\ln \left(\frac{2}{\epsilon} \right) - \gamma + \frac{4\epsilon}{\pi} - \left(\frac{\epsilon^2}{2} \right) \ln \left(\frac{2}{\epsilon} \right) \right]}{\left[1 - \left(\frac{\epsilon^3}{\pi} \right) \ln \left(\frac{2}{\epsilon} \right) + \frac{c_1 \epsilon^{b_1}}{1 + c_2 \epsilon^{b_2}} \right]} \quad (1.3)$$

mit dem reduzierten Radius $\epsilon = \frac{R\mu_w}{\mu_m h}$ und den Konstanten $c_1 = 0,73761$, $b_1 = 2,74819$, $c_2 = 0,52119$ und $b_2 = 0,61465$. Diese Gleichung ist eine sehr gute Näherung des Hughes-Pailthorpe-White Modells (Abbildung 1.7). Damit ist es möglich, gemessenen Diffusionskoeffizienten entsprechende Partikelgrößen und Membranviskositäten über einen großen Bereich zuzuordnen.

Möglicherweise müssen aber neben den Viskositäten der umgebenden Flüssigkeit sowie der Membran, ihrer Dicke und dem Partikelradius noch weitere Faktoren einbezogen werden, um die Diffusion von Proteinen in Modellmembranen vollständig beschreiben zu können. Es

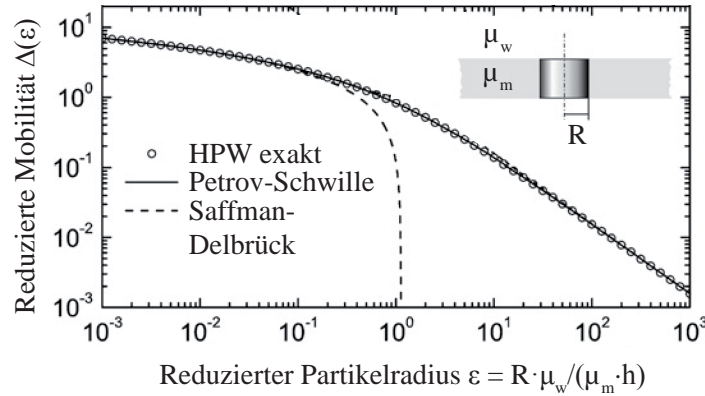


Abbildung 1.7: Theoretische Modelle für die laterale Membrandiffusion. Modifizierte Abbildung von Petrov und Schwille [67]. Die Abbildung gibt die Abhängigkeit der reduzierten Mobilität vom Partikelradius an. Die gestrichelte Linie zeigt die Kurve nach dem Saffman-Delbrück-Modell, die Kreise den Verlauf für das Hughes-Pailthorpe-White-Modell und die durchgezogene Linie die Näherung durch Petrov und Schwille. Deren analytischer Ausdruck stimmt sehr gut mit dem Verlauf des Hughes-Pailthorpe-White (HPW)-Modells überein, das die beste Beschreibung für die Diffusion eines zylinderförmigen Partikels in einer fluiden Membranschicht mit angrenzenden Flüssigkeiten liefert.

wurde nämlich in Einzelmolekülverfolgungsexperimenten gezeigt, dass die Proteindiffusion auch von einem Zusammenspiel aus Membrankrümmung, Membranspannung und Proteinform abhängt [68]. Die Autoren führen zur Erklärung an, dass durch die vom Protein lokal induzierte Membrandeformation eine effektive Reibung entsteht.

1.2.2 Krümmung und Deformation

Die Elastizität von Membranen ist ein entscheidender Faktor für die Zellmorphologie. Sie ist eine Eigenschaft, die bei Prozessen notwendig ist, bei denen die Form der Membran neu angepasst werden muss. Beispiele dafür sind die Zellteilung und das Zellwachstum. Aber auch zellinterne Funktionen wie der Vesikeltransport im Golgiapparat [69] und die Signalübertragung in Neuronen [70] erfordern die Deformation der Membran durch ein abgestimmtes Wechselspiel zwischen Lipiden und Proteinen.

Die Struktur, Dynamik und Stabilität von Lipiddoppelschichten werden von thermodynamischen Kräften kontrolliert. Eine selbstorganisierte Lipiddoppelschicht kann frei expandieren oder sich zusammenziehen, bis die Freie Energie minimiert wird. Das Minimum der Freien Energie, welches das Gleichgewicht der Lipiddoppelschicht bestimmt, entsteht durch eine Balance zwischen entgegengesetzten Kräften innerhalb der Schicht. Ist das mechanische Gleichgewicht erreicht, ist die Summe der Kräfte, die in der Lipiddoppelschicht wirken (die lateralen Drücke), gleich Null. Der große Energieaufwand, der durch den Kontakt zwischen hydrophoben Seitenketten und Wassermolekülen entsteht, führt zu einer Grenzflächenspannung. Eine Möglichkeit, diese zu verringern, wäre die vollständig gestreckte Ausrichtung der

Lipidseitenketten, damit die Interaktionsflächen mit den Wassermolekülen minimiert und die van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten verstärkt werden. Einer solchen Ausrichtung wirkt aber die Konformationsentropie der Seitenketten (und Kopfgruppen) entgegen. Diese entgegengesetzten Energiebeiträge führen zu einem Profil der lateralen Drücke in der Lipiddoppelschicht wie in Abbildung 1.8 A gezeigt. Das laterale Druckprofil wird stark durch Variationen der Lipidzusammensetzung, z. B. den Zusatz von Cholesterin, und der Lipidstruktur, z. B. die Position der Doppelbindungen, beeinflusst [71].

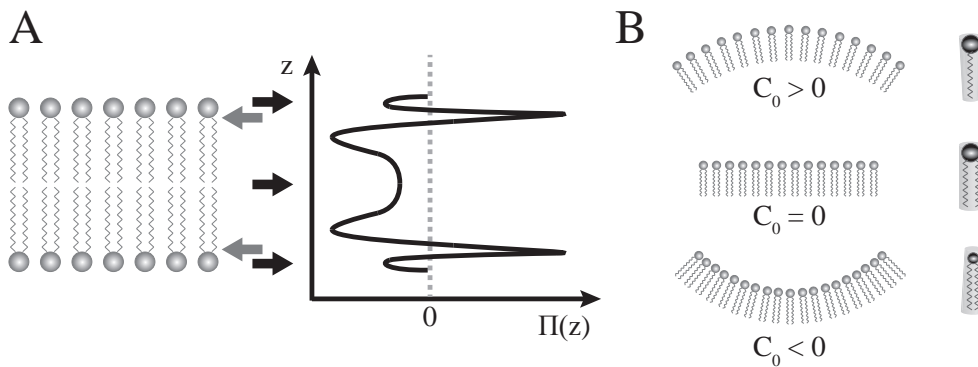


Abbildung 1.8: Abbildung (A) zeigt das laterale Druckprofil einer Doppelschicht aus Phospholipiden entlang der Membrannormalen [71]. In der Kopfgruppenregion und im Inneren der Lipiddoppelschicht entstehen repulsive Kräfte durch Entropieeffekte. An der Grenzfläche zwischen Seitenketten und Kopfgruppen wirken dagegen attraktive Kräfte, die durch die Verringerung der Interaktionsfläche zwischen den Seitenketten und Wassermolekülen entstehen. In Abbildung (B) sind Lipidmonoschichten mit positiver Krümmung (oben), ohne Krümmung (Mitte) und negativer Krümmung (unten) gezeigt. Die Krümmung wird durch die Form der Lipidmoleküle bestimmt.

Herrscht eine Asymmetrie zwischen den beiden Schichten der Lipiddoppelschicht, entweder durch eine unterschiedliche Anzahl an Lipiden oder eine unterschiedliche Form der Lipide, kommt es zu einer Krümmung der Membran. Dabei wird das Biegemoment durch das laterale Druckprofil bestimmt. Denn durch das Krümmen der Membran wird vor allem der laterale Druck in der Kopfgruppenregion der einen Schicht vermindert, bis die Summe der lateralen Drücke wieder gleich Null ist [72].

Charakteristisch für jede Lipidspezies ist die spezifische, intrinsische Krümmung C_0 , die sie abhängig von ihrer Form in Monoschichten ausbilden (Abbildung 1.8 B). Diese intrinsische (oder spontane) Krümmung bestimmt, in welcher Phase (hexagonal, lamellar etc.) die Lipide bevorzugt vorliegen. Es ist deshalb möglich, das Phasenverhalten von Lipiden durch einen einfachen geometrischen Parameter zu beschreiben, den sogenannten Israelachvili–Mitchell–Ninham-Packungsparameter $P = \frac{V}{a \cdot l}$ mit dem molekularen Volumen V , der Querschnittsfläche der Kopfgruppe a und der Moleküllänge l [73]. Die Variation der Lipidzusammensetzung ist für Zellen ein entscheidender Parameter, um die Struktur und Funktion von Membranproteinen zu regulieren, da sich die Lipidform auf das Phasenverhalten und die Krümmung der Membran auswirkt [74].

Umgekehrt können Proteine die Krümmung der Membran beeinflussen, indem sie Kräfte auf die Membran ausüben z. B. Zug- oder Biegekräfte. Diese können in Zellen oder Vesikeln zu einer Deformation der Membran führen, sodass sich kleine Vesikel abschnüren und Röhrrchen bilden. Für solche Prozesse finden sich viele Beispiele, das bekannteste ist wahrscheinlich der kontrollierte Vesikeltransport durch Proteinbeschichtungen („protein coats“). Die dabei benötigten Biegekräfte entstehen durch die asymmetrische Adsorption von Proteinen. Durch Untersuchungen an Riesenvesikeln ist aber auch bekannt, dass die Adsorption von anderen Molekülen eine lokale Deformation der Membran bewirken kann. So erhöhten verankerte Polymere die Membrankrümmung bis zu einer Vesikelabschnürung [75]. Auch antimikrobielle Peptide wie Melittin induzierten eine Vesikelabschnürung [76].

Allgemein ist der Prozess der lokalen Membrandeformation durch die Adsorption von Partikeln in Abbildung 1.9 dargestellt. Man kann diesen Prozess in drei Schritte einteilen: 1. die Adsorption von Partikeln, die durch die Bindungskonstante bestimmt wird, 2. die (diffusionskontrollierte) Domänenbildung durch Aggregation der Partikel und 3. die Membrandeformation ab einer bestimmten Domänengröße, die von der Anzahl der lokal akkumulierten Partikel abhängt [77].

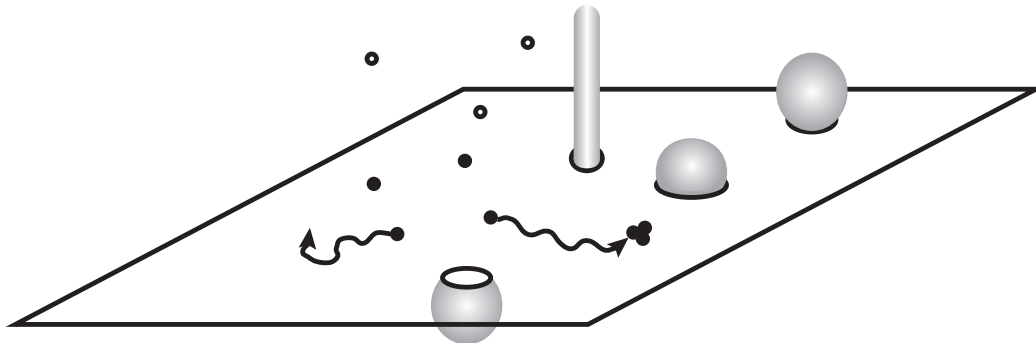


Abbildung 1.9: Die Abbildung zeigt schematisch die Adsorption von Partikeln an eine Lipiddoppelschicht, ihre diffusionsgesteuerte Aggregation und die lokale Deformation der Membran durch Vesikelknospung oder Röhrrchenbildung. Die flache Lipiddoppelschicht separiert die innere und äußere Flüssigkeit. Nur in der äußeren Flüssigkeit sind Partikel enthalten, die an die Membran adsorbieren können. Die Bindungskonstante wird durch die Adsorptions- und Desorptionsraten k_{on} und k_{off} bestimmt. Gleichzeitig aggregieren die adsorbierten Partikel zu Domänen, die ab einem bestimmten Radius, also einer bestimmten Zahl an Partikeln, zu einer Membrandeformation führen. Abbildung nach [77].

Die Bindung an die Membran wird durch viele verschiedene, molekulare Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und der Membran bestimmt. Interessant ist aber, dass auch die lokale Krümmung der Membran selbst die Bindung von bestimmten Partikeln unterstützen kann. Amphipatische α -Helices binden durch Insertion ihrer hydrophoben Domäne in die Lipiddoppelschicht an die Membran. Dieser Prozess wird bei einer positiven Krümmung

der Membran begünstigt, da der hydrophobe Teil der Membran besser zugänglich wird. Amphipatische α -Helices sind deshalb ein Strukturmotiv, das mit der Erkennung von Membrankrümmung verbunden wird [78].

Die darauffolgende Aggregation der Partikel kann unterschiedliche Ursachen haben, einige davon sind: unspezifische Wechselwirkungen wie elektrostatische Anziehungen, spezifische Wechselwirkungen wie Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen, eine lokale Begrenzung der Bindung und Mobilität durch Lipiddomänen [79] oder die Überwindung der Translationsentropie durch membranassoziierte Interaktionsenergien [80]. Diese membranvermittelten, indirekten Wechselwirkungen entstehen durch eine Änderung der lateralen Drücke und der Membranelastizität bei der Adsorption und (teilweisen) Insertion [80] und können auch krümmungsinduziert sein [81].

Zu der mechanistischen Ursache der Membrandeformation gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Die Insertion von amphipatischen Partikeln verursacht abhängig von der Tiefe ihres Eindringens eine asymmetrische Perturbation in den beiden Einzelschichten der Membran. Solch eine Asymmetrie kann nach dem Lipiddoppelschicht-Kopplungs-Modell [82] eine Modulation der Membranform nach sich ziehen, weil durch die Partikeladsorption die betroffene Schicht der Membran relativ zu der anderen Schicht schnell expandiert. Währenddessen bleibt aber der Kontakt zwischen den Schichten durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen bestehen. Die Minimierung der Biegeenergie, um den veränderten lateralen Druck auszugleichen, resultiert dann in einer Änderung der Membrankrümmung. Ein weiterer Mechanismus besteht in der Übertragung der gekrümmten Form der adsorbierten Moleküle oder Molekülaggregate auf die Membran, wodurch die adsorbierten Moleküle wie ein Templat wirken. Die adsorbierten Moleküle müssen dafür eine genügend große Steifigkeit besitzen, um zu verhindern, dass die Membran wieder in den Zustand ihrer spontanen Krümmung relaxiert. Außerdem müssen die Molekül-Membran-Wechselwirkungsenergien die Biegeenergie der Membran kompensieren [83].

1.3 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (antimicrobial peptides, AMPs) besitzen eine breite antimikrobielle Aktivität gegen Bakterien, Viren und Pilze. Deswegen verfügen sie über ein hervorragendes Potenzial als Antibiotika.

Die antimikrobielle Aktivität von bestimmten Substanzen wurde zum ersten Mal 1896 beschrieben, als in Weizenmehl eine Substanz nachgewiesen wurde, die letal für Brothefe war [84]. Besonders bekannte Beispiele von Substanzen mit antimikrobieller Aktivität sind zum einen das Lysozym, das Ende der 1920er Jahre von Alexander Fleming identifiziert wurde und die Zellwand von Bakterien enzymatisch zerstört [84]. Zum anderen wurde 1928, ebenfalls von Fleming, das Penicillin entdeckt. Ab den 1940er Jahren wurde es therapeutisch genutzt und Fleming erhielt zusammen mit Howard Florey und Ernst Chain 1945 den Nobelpreis [85].

Die ersten Peptide, deren antimikrobielle Aktivität entdeckt wurde, waren 1925 die Colicine aus *Escherichia coli* [86]. Die ersten AMPs, die als Peptid-Antibiotika kommerziell produziert [87] wurden, sind seit 1939 bekannt. Die Gramicidine wurden aus *Bacillus brevis* isoliert und sind gegen eine Vielzahl an Gram-positiven Bakterien aktiv [88].

1.3.1 Vorkommen und Klassifizierung

Antimikrobielle Peptide finden sich in allen Organismen. Ihre weitreichende Verbreitung im Reich der Pflanzen und Tiere zeigt, dass sie eine fundamentale Rolle in der erfolgreichen Evolution mehrzelliger Organismen gespielt haben [89]. Dies liegt daran, dass AMPs ein essentieller Bestandteil der natürlichen Immunabwehr aller mehrzelligen Organismen sind. Mit ihrer Fähigkeit, Mikroben abzutöten, werden sie als eine der ersten Maßnahmen der Immunabwehr gegen eine bakterielle Infektion eingesetzt. Aber zusätzlich zu dieser rein antimikrobiellen Funktion gibt es auch immer mehr Hinweise auf immunomodulierende Eigenschaften der AMPs. Das zeigt sich darin, dass sie wichtig für so verschiedene Funktionen wie Wundheilung und Chemotaxis sind [90].

Von Bakterien werden AMPs eingesetzt, um das Wachstum anderer Stämme derselben oder ähnlicher Bakterienarten zu hemmen [91]. Dabei werden die bakteriellen AMPs, die Bacteriocine, vom ganzen Stamm abgesondert. Es gibt Hinweise darauf, dass die Bacteriocinproduktion die Fähigkeit von probiotischen Bakterienstämmen erhöht, sich in komplexen, bakteriellen Gemeinschaften zu behaupten [92]. Diese Eigenschaft macht sie attraktiv für die pharmazeutische und Lebensmittelindustrie.

AMPs lassen sich auf verschiedene Arten klassifizieren. Kriterien bilden dabei ihr biologischer Ursprung, ihre Struktur und ihr Wirkmechanismus. Heutzutage sind in der Datenbank

(The Antimicrobial Peptide Database, APD) des Medizinischen Zentrums der Universität von Nebraska [93] die Sequenzen von ≈ 2400 AMPs registriert. Die Klassifizierung nach ihrem biologischen Ursprung zeigt, dass der weitaus größte Anteil der bekannten AMPs von tierischen Peptiden gestellt wird (Abbildung 1.10). Diese lassen sich weiter in z. B. Insekten-, amphibische, Fisch-, Reptilien- und Säugetierpeptide klassifizieren. Die größten und am besten untersuchten Familien der tierischen AMPs sind die Cathelicidine, Defensine und Histatine [93]. Kleinere Gruppen bilden die pflanzlichen und bakteriellen Peptide. Mittlerweile werden im Hinblick auf therapeutische Einsatzmöglichkeiten auch immer mehr synthetische Peptide entwickelt.

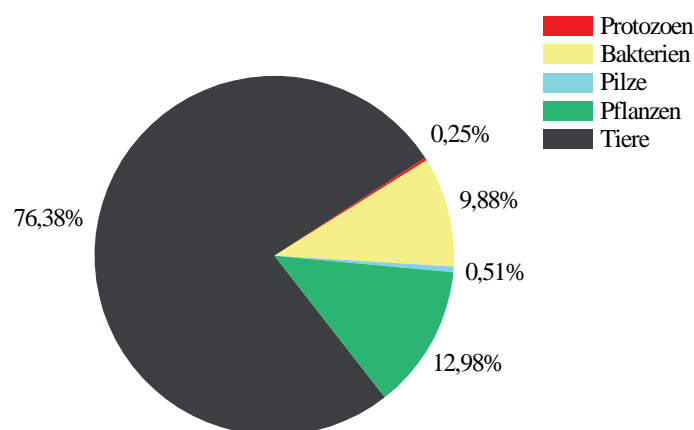


Abbildung 1.10: Taxonomie der Herkunftsorganismen antimikrobieller Peptide. Entnommen aus der APD-Datenbank am Medizinischen Zentrum der Universität von Nebraska [93].

Eine weitere Klassifizierung der AMPs, in die sich auch synthetische AMPs einordnen lassen, kann aufgrund ihrer Struktur vorgenommen werden. Vier Sekundärstrukturtypen werden besonders häufig genannt: α -Helix, β -Faltblatt, gemischte Strukturen aus α -Helix und β -Faltblatt sowie ungefaltete Strukturen. Allerdings sind nur für gut 40 % [93] der in der Datenbank aufgenommenen Peptide Strukturdaten vorhanden. Aber auch ohne Informationen über die Sekundärstruktur lassen sich Merkmale wie Größe, Gesamtladung, Amphipazität und Hydrophobizität (Abschnitt 1.3.3) bestimmen und zur Systematisierung nutzen.

Als weitere Möglichkeit zur Systematisierung lassen sich mit Blick auf ihre biologischen Aktivitäten entsprechend ihres Wirkspektrums weitere charakteristische Eigenschaften benennen z. B. antibakteriell, antiviral oder antimykotisch. Auch anhand ihrer spezifischen Wirkmechanismen können sie unterteilt werden, z. B. in zelloberflächenaktive oder intrazellulär aktive Peptide. Eine genauere Aufteilung kann durch Angabe der Zielstruktur oder des Zielmoleküls, wie z. B. die Zellwand, die Zellmembran sowie Membranrezeptoren, Hitzeschockproteine, DNA oder RNA, erfolgen.

Die immer weiter zunehmende Resistenz von Bakterien gegenüber konventionellen Antibiotika weckt das Interesse an neuen Wirkstoffen zur Entwicklung von wirksamen Medikamenten. Resistenzen können entwickelt werden, indem Bakterien die Antibiotika z. B. durch Proteaseenzyme strukturell modifizieren, sodass sie wirkungslos werden, oder sie durch Transportproteine wieder aus der Zelle entfernen. Dies sind Mechanismen, die Bakterien auch zum eigenen Schutz verwenden, wenn sie selbst Produzenten von antimikrobiellen Peptiden sind. Ein weiterer Resistenzmechanismus besteht in der Modifizierung der AMP-Zielstruktur. Z. B. kann der betroffene Stoffwechselweg oder die Lipidzusammensetzung der Zellmembran verändert werden [94]. Dadurch wird eine Bindung der Antibiotika verhindert.

Obwohl AMPs aufgrund ihrer biologischen Aktivitäten ein großes Potential als neue Antibiotika besitzen, ist ihre klinische und kommerzielle Entwicklung als Arzneimittel durch verschiedene Aspekte noch limitiert. Eine große Hürde besteht in den sehr hohen Dosen, mit denen natürlich vorkommende Peptide (z.B. Magainin) trotz ihrer hohen *in vitro*-Aktivität gegen Infektionen eingesetzt werden müssten [89]. Diese liegen für eukaryotische Zellen oft im toxischen Bereich. Weitere Probleme liegen in der Suszeptibilität für Proteasen und der damit verbundenen Degradierung sowie den hohen Kosten der Peptidsynthese. Aus diesen Gründen werden Anstrengungen betrieben, möglichst kurzkettige, synthetische AMPs zu entwickeln und nicht-natürliche Aminosäuren zu verwenden [95].

1.3.2 Wirkmechanismen

Die Haupteigenschaft der AMPs besteht in ihrer Fähigkeit, das Wachstum von Bakterien zu verhindern oder diese sogar zu töten. Um wirksam zu sein, müssen die Peptide spezifisch mit den Bakterien wechselwirken. Die molekularen Mechanismen dabei sind vielfältig. Ein sehr häufiges Angriffsziel ist die Zellmembran. Verschiedene generelle Wirkmechanismen sind in Abbildung 1.11 aufgeführt. Obwohl in der Abbildung schematisch so dargestellt, sind die einzelnen Mechanismen nicht unabhängig voneinander. Z. B. beeinflusst eine Lipidphasentrennung auch membran-assoziierte, enzymatische Reaktionen und die Bindung an DNA kann sich auch auf die Proteinsynthese auswirken. Deshalb wird heute angenommen, dass AMPs dann besonders wirkungsvoll gegenüber Bakterien sind, wenn sie gleichzeitig mehrere der dargestellten Effekte verursachen. Dafür spricht auch, dass AMPs durch ihr Zusammenwirken gegenseitig ihre Aktivität verstärken können. Diese synergistischen Effekte wurden in Modellsystemen beobachtet, sind aber möglicherweise sogar wesentlich für den Wirkmechanismus in ihrer natürlichen Umgebung. Es ist bekannt, dass viele Bakterien [96], Insekten [97], Amphibien [98] und Menschen [99] AMPs mit bekannten synergistischen Wechselwirkungen hervorbringen.

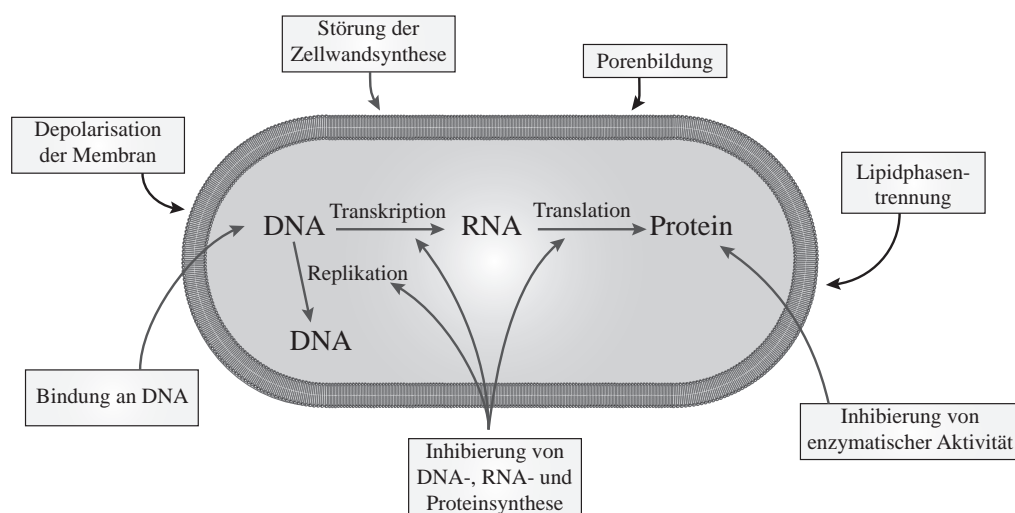


Abbildung 1.11: Die Abbildung stellt verschiedene, generelle Wirkmechanismen der antimikrobiellen Peptide dar. Ein häufiges Angriffsziel ist die Zellmembran der Bakterien, was eine Depolarisation oder Perforation der Membran zur Folge haben kann und die Protein- und Lipidfunktionalität stören kann. Außerdem gibt es AMPs, die im Inneren der Zelle aktiv werden und die DNA-, RNA- oder Proteinaktivität stören und durch Bindung an DNA oder Enzyme wichtige zelluläre Prozesse inhibieren können. Abbildung basierend auf [94].

Die Aktivität von antimikrobiellen Peptiden lässt sich durch Messung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) charakterisieren. Diese Konzentration gibt die geringste Konzentration des Stoffes an, die das Bakterienwachstum verhindert. Die meisten Peptide besitzen MHK-Werte im mikromolaren Bereich [100]. Dagegen gibt es wenige AMPs einer zweiten Gruppe, die schon in nanomolaren Konzentrationen aktiv sind [100]. Das lässt vermuten, dass es zwei generelle Wirkungsmechanismen gibt: einen unspezifischen, der nicht durch Rezeptoren vermittelt wird, und einen zweiten, der durch spezifische Wechselwirkungen mit Zielmolekülen initiiert wird [101]. Die Aktivität eines Peptids kann also durch Wechselwirkung mit spezifischen Zielmolekülen erhöht werden.

Das erste identifizierte Peptid dieser Gruppe war Nisin Z, das an das membrangebundene Trägermolekül der Peptidoglykaneinheit, Lipid II, bindet [100]. Nisin kombiniert die hohe Affinität für Lipid II und die damit verbundene Inhibierung der Zellwandbiosynthese mit der Fähigkeit zur Membranpermeation. Es ist diese Kombination, die das Peptid hochaktiv macht. Wenn die Lipid II-Bindungsdomäne entfernt wird, verliert das Peptid einen Teil seiner Wirksamkeit und ist nur noch im mikromolaren Konzentrationsbereich aktiv [100]. Das Beispiel von Nisin Z zeigt, dass Mechanismen, die auf der Wechselwirkung mit bakterienspezifischen Zielmolekülen beruhen, sehr wirkungsvoll sein können. Im Hinblick auf die Entwicklung von neuen Antibiotika, die längerfristig wirksam sein sollen, sind somit vor allem Wirkmechanismen besonders interessant, deren Zielmoleküle einerseits in überlebensrelevanten Prozessen der Bakterien zu finden sind und andererseits nicht leicht modifiziert werden können.

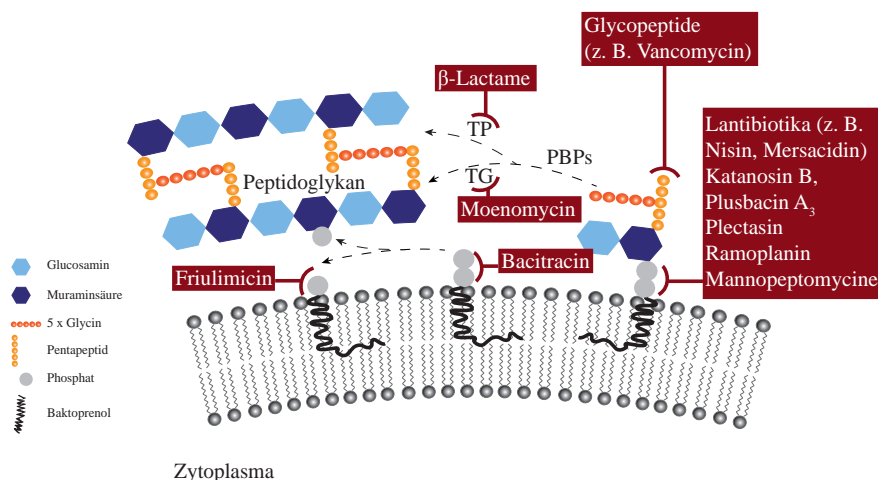


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung der Bindungsstellen von zellwandbiosynthese-selektiven Antibiotika. Die Antibiotika inhibieren Schlüsselreaktionen der Zellwandbiosynthese auf der Außenseite der bakteriellen Membran, indem sie direkt die Enzyme blockieren oder Komplexe mit den Baktoprenolkomponenten C_{55} -P, C_{55} -PP und Lipid II bilden. Abbildung basierend auf [26].

Ein Beispiel für einen solchen Prozess ist die in Abschnitt 1.1.1 beschriebene Zellwandbiosynthese. Bei diesem membran-assoziierten, enzymatischen Zyklus entsteht Lipid II, das den Zellen als Träger der Peptidoglykaneinheit dient. Peptidoglykan ist der Grundbaustein der bakteriellen Zellwand und deshalb ist Lipid II unverzichtbar für das bakterielle Wachstum und die Replikation. Alle auf der extrazellulären Seite der Membran lokalisierten Reaktionen und Zwischenprodukte bieten Angriffsziele für eine Vielzahl an Antibiotika [102, 26] (Abbildung 1.12).

Lipid II ist das häufigste Zielmolekül und dient antibiotischen Klassen wie Lantibiotika z. B. Nisin und Mersacidin, Defensinen z. B. Plectasin, Glykopeptiden z. B. Vancomycin und vielen mehr als Interaktionspartner [26]. Besonders effektiv wirken diese Antibiotika bei Gram-positiven Bakterien. In diesen Bakterien können kleine Moleküle wie AMPs mit einem Radius von bis zu 2 nm die Zellmembran durch Diffusion durch die Peptidoglykanschicht erreichen [103]. Dagegen bildet in Gram-negativen Bakterien die äußere Zellmembran eine zusätzliche Barriere für Lipid II-bindende Antibiotika. Da der Bedarf an Zellwandmaterial von Gram-positiven Bakterien außerdem deutlich höher ist als bei Gram-negativen Bakterien, ist auch die Zahl an Lipid II-Molekülen in den Zellen, und somit die Zahl der Angriffsziele, deutlich höher. Für Gram-negative *Escherichia coli* Bakterien wurde ein Pool von 1000-3000 Lipid II-Molekülen festgestellt, wohingegen der Pool verschiedener Gram-positiver Bakterien wie *Bacillus megaterium* oder *Staphylococcus aureus* 35.000-200.000 Lipid II-Moleküle umfasst [104] und damit bis zu 1 mol% der Phospholipide beträgt.

1.3.3 Strukturelle Faktoren für eine Membranaktivität

Obwohl die Wirkmechanismen der AMPs sehr vielfältig und teilweise sehr spezifisch sind, gibt es dennoch Gemeinsamkeiten [105]. Der wichtigste gemeinsame Nenner ist die Fähigkeit von fast allen antimikrobiellen Peptiden, mit der Lipiddoppelschicht der bakteriellen Zellmembran zu interagieren und deren strukturelle Ordnung zu stören. Dies kann, wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, unterschiedliche Folgen haben: die Peptide sind in der Lage, direkt die Membranintegrität zu stören, membran-assoziierte, physiologische Prozesse wie die Zellwandbiosynthese oder Zellteilung zu inhibieren und/oder durch Translokation der Membran mit zytoplasmatischen Zielmolekülen wechselzuwirken.

AMPs sind strukturell so verschieden wie ihre Wirkmechanismen. Trotzdem zeichnen sie einige vorherrschende, strukturelle Merkmale aus. Diese sind vermutlich durch die Notwendigkeit bedingt, mit der Bakterienmembran interagieren zu können. Einer dieser Faktoren ist die Gesamtladung der Peptide, die auch eine große Rolle für die Selektivität der AMPs für bakterielle Membranen spielt (Abschnitt 1.3.4). Die spezifische Bindung von AMPs an bakterielle anstatt tierische Zellmembranen beruht vornehmlich auf der elektrostatischen Anziehung zwischen positiv geladenen AMPs und der negativ geladenen Oberfläche und Membran der Bakterien [94]. Dafür spricht, dass die positive Gesamtladung die am besten konservierte Eigenschaft der AMPs ist [101]. Allerdings sind die Gesamtladungen breit verteilt mit einem Maximum im Bereich von +1 bis +5 (Abbildung 1.13 A), in dem zwei Drittel der in der APD-Datenbank aufgeführten AMPs liegen [93]. Die attraktiven, elektrostatischen Wechselwirkungen bestehen für tierische Membranen im Allgemeinen nicht, da sie eine asymmetrische Lipidverteilung besitzen. Auf der äußeren Seite dieser Zellmembranen befinden sich hauptsächlich neutrale Lipide, während die negativ geladenen Lipide auf der Innenseite angereichert sind [14].

Es gibt aber auch andere strukturelle Faktoren, die die Bindung der AMPs an die Bakterienmembran beeinflussen. Es ist den AMPs nur möglich, in den hydrophoben Bereich der Membran einzudringen, wenn ihre eigene Hydrophobizität groß genug ist. Der Anteil der hydrophoben Reste pro AMP variiert sehr stark, er reicht von 20 Prozent bis zu 70 Prozent (Abbildung 1.13 B) mit einem Maximum bei 50 Prozent. Allerdings korreliert eine Erhöhung der Hydrophobizität auch stark mit einer Toxizität für Säugetierzellen und einem Verlust der antimikrobiellen Selektivität [106]. Aber nicht nur der Anteil der hydrophoben und geladenen Aminosäuren an sich ist für die Bindung und Insertion der AMPs entscheidend, sondern auch deren räumliche Anordnung. Durch räumliche Separation der hydrophilen und hydrophoben Gruppen entstehen hydrophile und hydrophobe Domänen. Diese amphipatische Sekundärstruktur ermöglicht eine gerichtete Insertion in die Membran (Abschnitt 1.3.4).

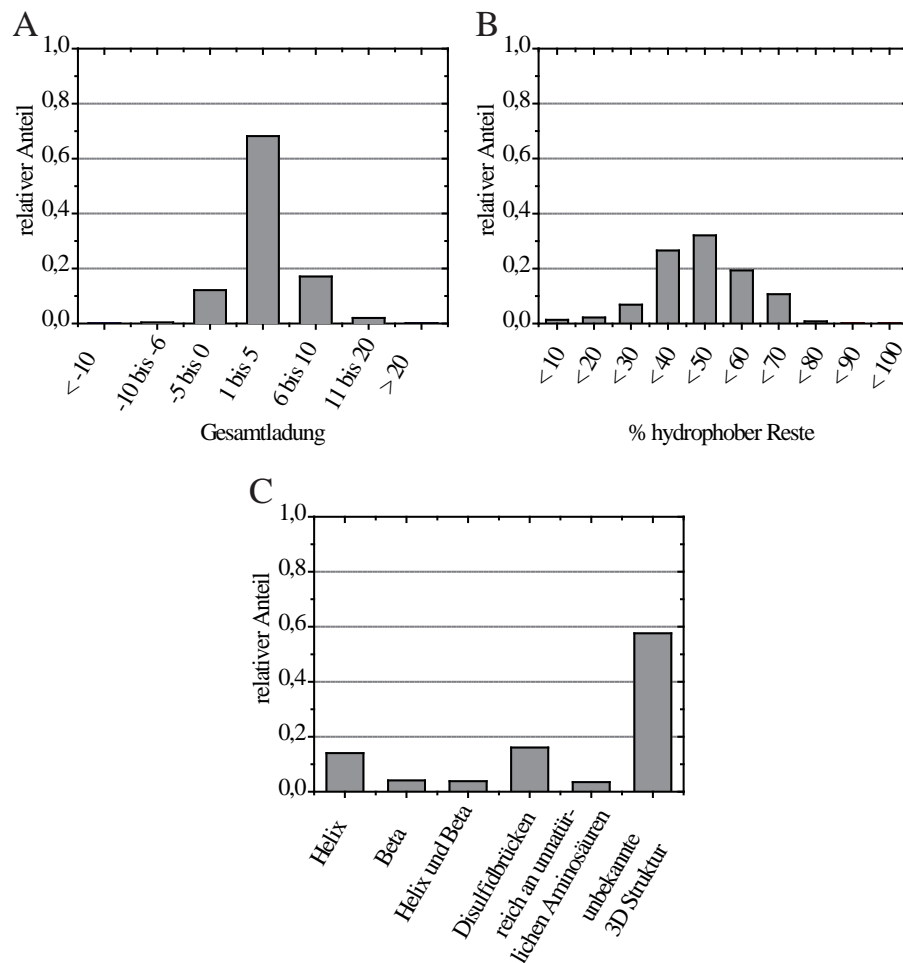


Abbildung 1.13: Strukturmerkmale antimikrobieller Peptide. Gezeigt sind die Häufigkeitsverteilungen der (A) Gesamtladung, (B) Hydrophobizität und (C) Sekundärstrukturmotive. Daten basierend auf der APD-Datenbank [93].

Die Fähigkeit zur Ausbildung einer amphipatischen Struktur ist wesentlich für die Aktivität der AMPs [106]. So sind amphipatische, α -helikale Peptide oft aktiver als Peptide mit weniger definierter Sekundärstruktur [94]. Die amphipatische α -Helix ist auch das häufigste Sekundärstrukturmotiv (Abbildung 1.13 C). Die amphipatischen Strukturen werden entweder durch die Interaktion mit der Membran stabilisiert oder durch funktionelle Gruppen intramolekular fixiert. So besitzt eine große Gruppe antimikrobieller Peptide in Lösung eine lineare, ungeordnete Struktur, nimmt aber in Anwesenheit von Mizellen und Membranen eine amphipatische Anordnung an [101, 94]. Sehr häufig treten auch Disulfidbrücken auf, die die amphipatische Struktur ebenfalls stabilisieren. Peptide ohne solche Brücken sind in wässriger Lösung oft ungeordnet [107] und das Entfernen von nur einer Disulfidbrücke kann die Faltung des Peptids erheblich verändern [108].

Die Vielfalt der AMPs, sowohl in Primär- als auch in Sekundärstruktur, legt nahe, dass ihre Membraninteraktion und ihre Wirkmechanismen durch eine Kombination struktureller und physikochemischer Eigenschaften wie der Größe, der Gesamtladung, der Sekundärstruktur, der Hydrophobizität und dem amphiphilen Charakter bestimmt ist.

1.3.4 Membranaktivität von antimikrobiellen Peptiden

Die Bindung an die Lipidmembran ist sehr oft mit einer Konformationsänderung der Peptide und der Ausbildung einer stabilen Sekundärstruktur verbunden [94]. In Anlehnung an das am häufigsten vorkommende Strukturmotiv (Abschnitt 1.3.3), die α -Helix, wird die amphipatische Konformation der Peptide schematisch häufig als Zylinder dargestellt (Abbildung 1.14; hellblau: hydrophobe Aminosäuren, dunkelblau: hydrophile Aminosäuren).

Die Adsorption der Peptide führt zunächst zu einer Verdrängung der Lipide, was eine strukturelle Reorganisation der Membran zur Folge hat. Dies kann verschiedene Effekte hervorrufen (Abbildung 1.14). Bei niedrigen Peptid-zu-Lipid-Verhältnissen lagern sich die Peptide (im Fall einer elektrostatischen Bindung) zunächst parallel zu der Membran [109] in ihrer Kopfgruppenregion [110] an. Dies kann eine Änderung der Membrandicke bewirken. Meist kommt es zu einer Ausdünnung der Membran, was wesentlich zu ihrer Destabilisierung beiträgt. Der Ausdünnungseffekt der Membran ist spezifisch für jedes Peptid und proportional zur Peptidkonzentration [111]. In Bakterienmembranen kann die Peptidanlagerung auch eine Membrandepolarisation bewirken, was das Zellwachstum inhibiert [112]. Des Weiteren sind die adsorbierten Peptide in der Lage, die Lipidverteilung in der Membran wesentlich zu stören. So können positiv geladene AMPs korrelierend zu ihrer Gesamtladung eine Segregation negativ geladener Lipide bewirken [113].

Bei zunehmender Oberflächenkonzentration ist die Aggregation von Peptiden ein häufig beobachtetes Phänomen. Dies kann zu einer Segregation in peptidreiche und peptidarme Phasen führen [114]. Bei dem Vesikeltransport in eukaryotischen Zellen führt die lokale Aggregation von Membranproteinen zu einer kontrollierten Vesikelabschnürung. Die dafür benötigte Verformung der Membran wird häufig durch amphipatische, α -helikale Protein-domänen induziert. Die α -Helix ist auch das häufigste Sekundärstrukturmotiv, das man bei membrangebundenen, antimikrobiellen Peptiden findet (Abschnitt 1.3.3). Entsprechend ist eine Membrandeformation auch bei diesen Peptiden zu beobachten wie z. B. bei der Vesikelabschnürung des porenbildenden Melittins in den flüssigen Lipidphasen von GUVs [76].

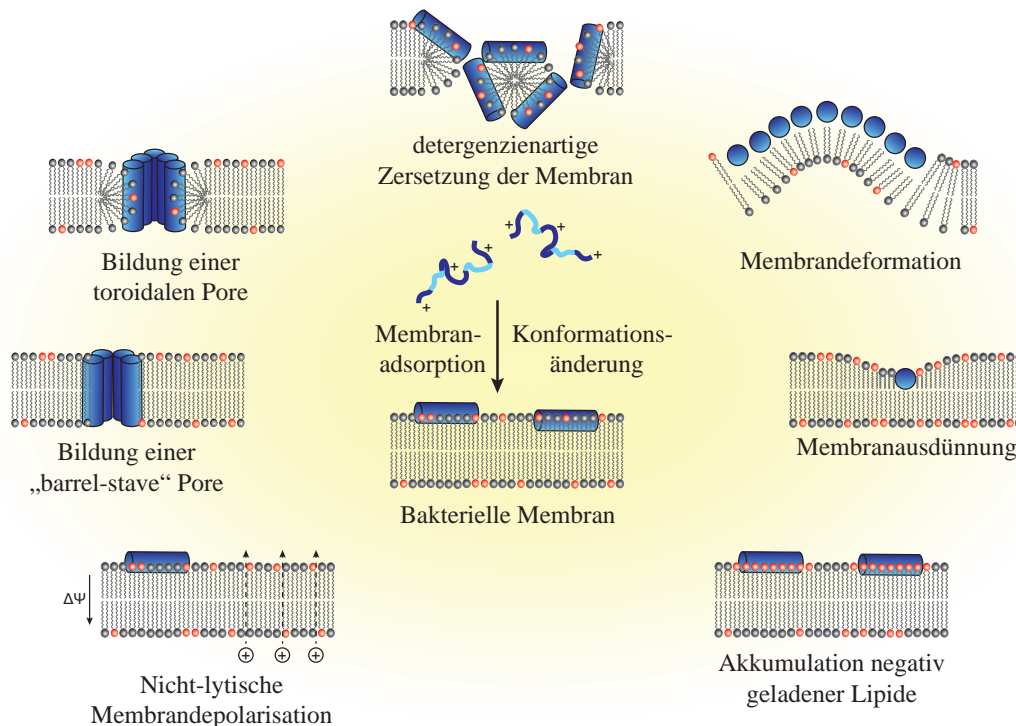


Abbildung 1.14: Effekte der Peptidadsorption. Durch Interaktion mit der Membran (grau: neutrale Lipide, rot: negativ geladene Lipide) kommt es oft zu einer Konformationsänderung der Peptide, bei der sich die geladenen (dunkelblau) und hydrophoben (hellblau) Aminosäuren räumlich entgegengesetzt ausrichten. Die Bindung der Peptide verursacht eine Reorganisation der Membran, was zu einer Deformation, Ausdünnung, Lipidakkumulation und Depolarisation führen kann. Durch Aggregation der Peptide können definierte Poren entstehen, die „barrel-stave“- und toroidale Pore, oder die Membran kann durch einen detergenzienartigen Mechanismus zersetzt werden. Abbildung basierend auf [115].

Die Aggregation von Peptiden führt auch zu einer erhöhten Permeabilität und sogar Perforation der Membran. Diese Prozesse waren und sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen an Modellmembranen und es wurden viele verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, die zum Teil sehr spezifisch für die untersuchten Peptide sind. Dazu gehören Prozesse wie die molekulare Elektroporation, detergenzienartige Zersetzung der Membran und stabile Porenbildung [116]. Die bekanntesten Porenbildungsmechanismen sind in Abbildung 1.14 dargestellt. Aggregieren horizontal, d.h. parallel, zu der Membranebene orientierte Peptide, kann das die Auflösung der Membran, wie bei Detergenzien beobachtet, bewirken [117]. Eine Oligomerisierung führt dagegen zu einer gerichteten Selbstorganisation der Peptide, aus der stabile, sogenannte „barrel-stave“ Poren definierter Größe und Struktur entstehen können [118]. Für die Bildung einer solchen Struktur müssen die Peptide von einer horizontalen zu einer vertikalen Orientierung übergehen [110]. Toroidale Poren entstehen dagegen nicht durch spezifische Peptid-Peptid-Wechselwirkungen, sondern durch die kooperative Änderung der Membrankrümmung [119, 120]. Neuere Molekulardynamiksimulationen deuten allerdings an, dass diese Porenstruktur nicht so stabil und geordnet ist wie bisher angenommen [121].

1.4 Wirkmechanismus des Lantibiotikums Nisin

Das antimikrobielle Peptid Nisin wird von vielen Stämmen des Milchsäurebakteriums *Lactococcus lactis* hergestellt und ist aktiv gegen eine Vielzahl an Gram-positiven Bakterien [122, 123]. Es wird bereits seit 50 Jahren als Konservierungsmittel für Lebensmittel verwendet. Trotz dieses langen Einsatzes gibt es kaum Berichte über Resistenzen gegen Nisin [124]. Der Grund dafür ist vermutlich sein besonderer Wirkmechanismus.

Nisin gehört zur Gruppe der Lantibiotika, deren charakteristisches Strukturmotiv die intramolekularen Lanthioninringe sind. Sie entstehen durch die Thioetherbrücken der Aminosäuren Lanthionin und 3-Methyllanthionin [125]. Es sind 5 verschiedene natürliche Varianten von Nisin bekannt, Nisin A, Nisin Z, Nisin Q, Nisin F und Nisin U [126]. Am längsten bekannt sind die Strukturen von Nisin A [125] und Nisin Z [127], die sich nur in einer Aminosäure an Position 27 unterscheiden. In dieser Arbeit wurde Nisin Z verwendet. Seine Struktur ist schematisch in Abbildung 1.15 gezeigt.

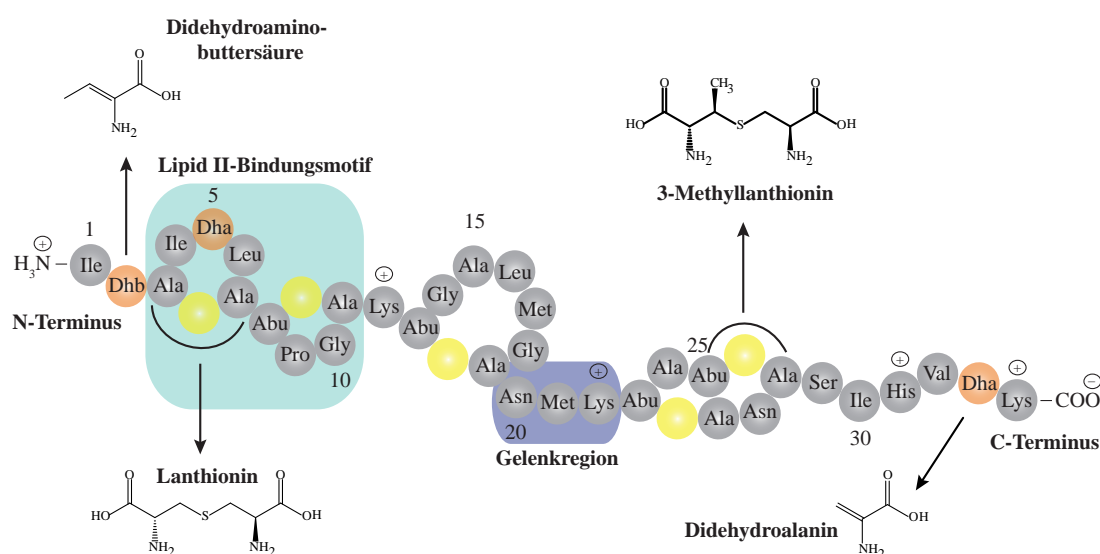


Abbildung 1.15: Schematische Struktur von Nisin. Nisin besitzt 34 Aminosäuren, davon die zwei namensgebenden Aminosäuren Lanthionin und 3-Methyllanthionin und zwei weitere unnatürliche Aminosäuren, Didehydroalanin und Didehydroaminobuttersäure (orange). Nisin besitzt 5 intramolekulare Ringe, die durch Thioetherbindungen (gelb) entstehen. Die zwei N-terminalen Ringe bilden das Lipid II-Bindemotiv. Die beiden Ringe formen dabei einen Käfig um die Pyrophosphatgruppe des Lipid II-Moleküls. Die Gelenkregion zwischen Aminosäure 20 und 25 ermöglicht dem Nisinmolekül, nach Bindung an Lipid II in die Membran einzudringen. Diese Flexibilität ist für seine Aktivität notwendig.

Nisin ist ein Peptid aus 34 Aminosäuren. Es ist ein Mitglied der Untergruppe der Typ-A Lantibiotika. Die Peptide dieser Gruppe besitzen alle eine gestreckte, flexible, amphipatische Struktur mit einer positiven Gesamtladung [128]. Bei einem leicht sauren pH-Wert

von $\text{pH} = 5.5$ ist die Aktivität von Nisin am höchsten [129] und es besitzt aufgrund von 3 Lysinresten und einem Histidinrest eine Gesamtladung von $+4$ [130]. Nisin enthält neben Lanthionin und 3-Methyllanthionin zwei weitere unnatürliche Aminosäuren, Didehydroalanin und Didehydroaminobuttersäure. Die unnatürlichen Aminosäuren werden durch posttranslationale Modifizierungen des Vorläuferpeptids synthetisiert.

In Lösung besitzt Nisin eine größtenteils ungeordnete Sekundärstruktur [131]. Wie andere, positiv geladene Peptide nimmt es aber bei der Interaktion mit Membranen durch Konformationsänderungen eine amphiphile Struktur an [109]. Von Nisin war schon seit Mitte der 1980er Jahre bekannt, dass es die Membran von Gram-positiven Bakterien perforiert. Daher wurde zunächst angenommen, dass es wie viele andere amphipatische, antimikrobielle Peptide Bakterien tötet, indem es die Integrität ihrer Zellmembranen zerstört [132]. So wurde auch in Studien an Modellmembranen gezeigt, dass Nisin die Lipiddoppelschicht von großen, unilamellaren Vesikeln (large unilamellar vesicles, LUVs) permeabilisieren kann. Dafür sind jedoch mikromolare Konzentrationen nötig [133]. Allerdings liegt die minimale Hemmkonzentration (MHK) im nanomolaren Bereich, wenn es gegen Gram-positive Bakterien angewendet wird [134]. Diese Beobachtung widersprach einem einfachen, ungerichteten Membranperforationsmechanismus und legte einen spezifischen Wirkmechanismus nahe. In weiteren Studien wurde das Zellwandvorläufermolekül Lipid II als spezifischer Bindungspartner identifiziert [135].

Das Besondere an Nisin ist sein dualer Wirkmechanismus. Die Bindung an Lipid II bewirkt zum einen, dass Nisin die Membran schon in nanomolaren Konzentrationen perforiert [135, 133] und dabei Löcher in die Membran reißt, die einen Durchmesser von 2-2,5 nm besitzen [136]. Auch wenn die Membranpermeabilisierung ein wichtiger Bestandteil des Wirkmechanismus von Nisin ist, hat die Bindung an Lipid II noch andere Auswirkungen. Diese führt zusätzlich zu der Porenbildung zu einer Segregation der Lipid II-Moleküle. Beobachtet man die Interaktion von fluoreszenzmarkiertem Nisin mit der Bakterienmembran, ist bemerkenswert, dass die Peptide nicht homogen an der Membran verteilt, sondern in großen Aggregaten akkumulieren (Abbildung 1.16) [137]. Die Aggregatbildung von fluoreszenzmarkiertem Nisin wurde ebenfalls an Lipid II-haltigen unilamellaren Riesenvesikeln (giant unilamellar vesicles, GUVs) beobachtet [137]. In diesen Aggregaten sind sowohl Lipid II als auch Nisinmoleküle akkumuliert [52]. Durch die Aggregation wird Lipid II irreversibel aus dem Reaktionszyklus entfernt und vermutlich auch die strukturelle Organisation der an der Zellwandbiosynthese beteiligten, enzymatischen Synthesekomplexe gestört. Morphologische Veränderungen der bakteriellen Zellmembran an Stellen mit hohem Zellwandwachstum könnten ein Resultat solcher Störungen sein [138]. Zu diesen morphologischen Effekten gehören auch die Bildung mehrerer Septen und die Zellwandbildung abseits der Zelloberfläche (Abbildung 1.16).

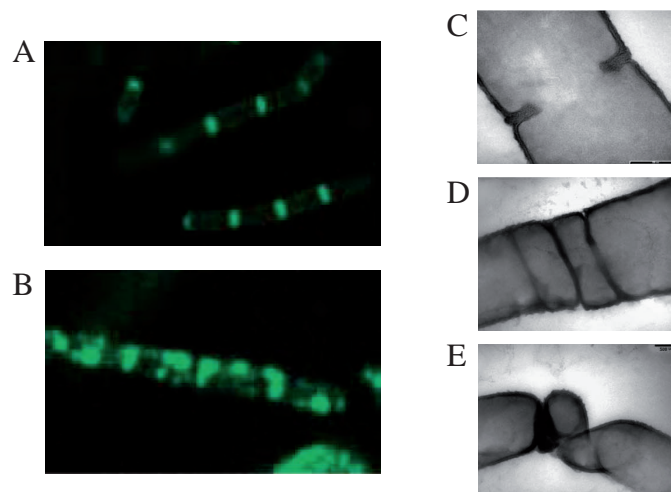


Abbildung 1.16: (A) und (B) zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Bacillus subtilis*. Ohne Behandlung mit Nisin (A) ist Lipid II (Markierung durch fluoreszenzmarkiertes Vancomycin) an den Septen lokalisiert. Nach Inkubation mit 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fluoreszenzmarkiertem Nisin (B) bilden sich dagegen in der gesamten Zelle Lipid II-Aggregate. Die Bilder wurden aus [137] entnommen. (C), (D) und (E) zeigen Elektronenmikrographen von *Bacillus subtilis*. Septenbildung in unbehandelten Zellen von *Bacillus subtilis* (C) und nach Behandlung mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Nisin für 30 Minuten (D,E). Die hohe Nisinkonzentration führt zu einer mehrfachen Septenbildung mit einer anormalen Orientierung, einer Septenbildung abseits der Zelloberfläche und einem Anschwellen der Zellen. Bilder wurden aus [138] entnommen.

Bei der Bindung von Nisin an Lipid II bildet wahrscheinlich das Peptid einen Käfig um die Pyrophosphatgruppe des Lipid II-Moleküls [139]. Dadurch wird eine Umorientierung von Nisin an der Membran bewirkt [140]. Im Vergleich zur fast parallelen Orientierung an negativ geladenen Membranen dringt die flexible Region zwischen dem dritten und vierten Lanthioninring tiefer in die Membran ein. Somit funktioniert diese Region in der Mitte des Peptids wie ein Gelenk. Die Konformationsänderung und das damit verbundene Eindringen von Nisin in die Membran scheinen Voraussetzungen für die Permeationsfähigkeit von Nisin zu sein. Wenn nämlich die strukturelle Flexibilität in dieser Region durch Mutation der Aminosäuren 20 und 21 unterdrückt wurde, konnte keine Permeabilisierung an Lipid II-haltigen Vesikeln mehr beobachtet werden [133]. Es wird außerdem vermutet, dass der C-Terminus von Nisin die Membran durchdringt und Nisin durch die Bindung an Lipid II eine transmembrane Orientierung einnimmt [141, 140].

Die Permeabilisierung der Membran von Nisin durch Bindung an Lipid II wurde in vielen Studien untersucht. Daraus wurde ein bis heute anerkanntes Porenmodell entwickelt. Vorbilder dafür waren vermutlich die klassischen Porenmodelle von „barrel-stave“ und toroidalen Poren. An Membranen von LUVs führte ein Nisin-zu-Lipid II-Konzentrationsverhältnis von

2:1 zu einer maximalen Perforation der Membran [142, 136]. Die Zahl der Lipid II-Moleküle je Pore wurde anhand von fluoreszenzspektroskopischen Messungen bestimmt. Aus diesen Messungen folgerten die Autoren, dass die Poren vier Lipid II-Moleküle enthielten. Zusammengekommen ergaben die Messungen und Schlussfolgerungen das Bild stabiler Oligomere bestehend aus vier ringförmig angeordneten Lipid II-Molekülen mit acht gebundenen Nisinmolekülen in transmembraner Orientierung [142].

1.5 Motivation und offene Fragestellungen

Mittlerweile treten immer häufiger antibiotika-resistente, pathogene Bakterienstämme in Krankenhäusern auf. Deshalb ist es notwendig, dass neue Klassen von Antibiotika entwickelt werden. Antimikrobielle Peptide besitzen dabei ein großes Potential zur therapeutischen Anwendung. Sie sind oft potente Breitbandantibiotika und besitzen teilweise positive immunomodulatorische Eigenschaften. Erfolgversprechend für die Anwendung sind vor allem Peptide, die aufgrund ihrer spezifischen Wirkmechanismen eine geringe Toxizität gegenüber eukaryotischen Zellen aufweisen und in den attackierten Bakterien nur eine geringe Tendenz zur Resistenzentwicklung verursachen.

Die Klasse der Lantibiotika besitzt einen in dieser Hinsicht sehr wirkungsvollen Mechanismus. Lantibiotika binden spezifisch an Lipid II. Lipid II ist ein essentieller Baustein in der Zellwandbiosynthese und kommt besonders häufig in Gram-positiven Bakterien vor. Durch Bindung an Lipid II wird die Biosynthese inhibiert, was den Aufbau der für das Überleben der Bakterien essentiellen Zellwand verhindert.

Das bekannteste Peptid aus der Klasse der Lantibiotika, Nisin, bildet zudem mit Lipid II Poren in der Membran. Dies führt zu seinem einzigartigen, dualen Wirkmechanismus. Die Struktur des Nisin-Lipid II-Komplexes und die Permeationseigenschaften von Nisin wurden in vielen Studien untersucht. Dabei wurde ein Modell der Porenstruktur entwickelt, dass die Poren als stabile Oligomere aus vier Lipid II und acht Nisinmolekülen beschreibt [142]. Allerdings wurde auch beobachtet, dass fluoreszenzmarkiertes Nisin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Membran helle Aggregate bildete [137], die auf eine deutlich höhere Zahl an lokal akkumulierten Nisinmolekülen hindeuten.

Um den scheinbaren Widerspruch des existierenden Porenmodells zu dem Auftreten von großen Aggregaten aufzuklären, wurde in dieser Arbeit der Aggregationsprozess von Nisin genauer untersucht. Dafür wurde verschiedenen Fragestellungen nachgegangen. Zunächst wurde die Aggregatbildung von fluoreszenzmarkiertem Nisin an *Bacillus subtilis* beobachtet, wodurch die biologische Relevanz der Aggregatbildung analysiert werden sollte. Anschließend sollten strukturelle Parameter bestimmt werden, die entscheidend für die Aggregation sind. Dazu wurde die Aggregatbildung mit verschiedenen Nisinbindungspartnern quantifiziert. Außerdem wurde die Aggregatgröße mittels Diffusionsmessungen bestimmt. Somit sollte die Anzahl der in den Aggregaten enthaltenen Lipid II Moleküle abgeschätzt werden. Zum Schluss wurde die Auswirkung des Aggregationsprozesses auf die Membranstabilität untersucht, womit eine Korrelation zwischen Aggregations- und Permeationsverhalten überprüft werden sollte.

2 Ergebnisse

Im Fokus dieser Arbeit stand die Bedeutung des Aggregationsverhaltens von Nisin für seinen Wirkmechanismus. Dafür wurden verschiedene fluoreszenzmikroskopische Methoden verwendet. Die verwendeten Methoden für die Fluoreszenzmarkierung von Nisin und Lipid II, die Präparation der Modellmembranen und Proben für die Mikroskopie, die Durchführung der Experimente mit den verwendeten Geräteeinstellungen sowie die Datenanalyse sind im Methodenteil (Kapitel 5) genau beschrieben.

Mittels eines inversen Fluoreszenz-Videomikroskops wurde die biologische Relevanz der Aggregatbildung an Zellen des Bakteriums *Bacillus subtilis* analysiert. Um den Aggregationsprozess zu untersuchen, wurde das Membranmodellsystem der unilamellaren Riesenvesikel verwendet. Unter Verwendung von konfokaler Laserrastermikroskopie wurde die Interaktion von fluoreszenzmarkiertem Nisin mit diesen Modellmembranen direkt visualisiert. Dabei wurde der Einfluss sowohl unspezifischer als auch spezifischer Membraninteraktion auf die Aggregatbildung quantitativ analysiert. Als spezifische Interaktionspartner wurden die Baktoprenolkomponenten der Zellwandbiosynthese, C₅₅-P, C₅₅-PP, Lipid I und Lipid II, getestet. Um die Dynamik des Aggregationsprozesses zu untersuchen, wurde die Mobilität von fluoreszenzmarkiertem Lipid II in der Membran nach Zugabe von Nisin mittels Lichtblattmikroskopie gemessen. Es wurde erwartet, dass die Zugabe von Nisin die Mobilität der Lipid II-Moleküle verringert, da diese von Nisin komplexiert werden. Um die Nisin-Lipid II-Aggregation zu charakterisieren, wurden die Diffusionskoeffizienten von Lipid II in Abhängigkeit der Inkubationsdauer und der Nisinkonzentration bestimmt. Die gemessenen, repräsentativen Diffusionskoeffizienten wurden dann verwendet, um die Größe der Aggregate und die darin enthaltenen Molekülzahlen zu bestimmen. Außerdem wurden die Auswirkungen der Aggregation auf die Stabilität der Membran untersucht. Außerdem wurde die Permeationseffizienz von Nisin in Korrelation mit der Aggregatbildung gemessen. Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen aufgeführt.

2.1 Einfluss der Fluoreszenzmarkierung auf die Aktivität

2.1.1 Nisin

Von den vier bekannten, natürlich vorkommenden Nisinmolekülen wurde in dieser Arbeit Nisin Z verwendet. Vereinfachend wird dafür im Folgenden nur die allgemeine Bezeichnung Nisin verwendet. Um die Bindung an die Membranen von Riesenvesikeln zu visualisieren, wurde Nisin von Dr. Imke Wiedemann am C-Terminus mit Alexa Fluor 647 (AF647) fluoreszenzmarkiert (Abschnitt 5.1) und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Es wurde eine Empfindlichkeitsbestimmung gegenüber *Bacillus subtilis* durchgeführt, um die Aktivität von markiertem Nisin-AF647 und nativem Nisin zu vergleichen. Dazu wurde in einer Mikrotiterplatte zu den abgestuften Konzentrationen der beiden Nisinmoleküle jeweils ein definiertes Bakterien-Inokulum gegeben. Nach Inkubation über Nacht wurde verglichen, welche Konzentration an Nisin benötigt wurde, um ein Bakterienwachstum zu verhindern. Das Bakterienwachstum wurde von beiden Nisinmolekülen verhindert. Es wurde eine 10fach höhere Konzentration von Nisin-AF647 gegenüber unmarkiertem Nisin benötigt. Das zeigt, dass die antimikrobielle Aktivität von markiertem Nisin leicht reduziert war.

Als weiteres Zeichen seiner Aktivität wurde auch die Permeationsfähigkeit von Nisin an Lipid II-haltigen Vesikeln mittels eines Ausströmungsexperiments, wie in [133] beschrieben, untersucht. Dazu wurden kleine unilamellare Vesikel aus DOPC mit 0,05 mol% Lipid II präpariert, in die Carboxyfluorescein (CF) in so hoher Konzentration eingeschlossen war, dass seine Fluoreszenz intern gelöscht wurde (Abschnitt 5.5.2). Bei Zugabe von Nisin wurde die Membran perforiert. Dadurch konnte das CF in die umgebende Lösung diffundieren, wurde auf diese Weise verdünnt und die Fluoreszenzlöschung wurde aufgehoben. Der damit verbundene Fluoreszenzanstieg diente als Indikator der Membranpermeation. Um die Permeationseffizienz von markiertem und unmarkiertem Nisin zu vergleichen, wurden gleiche Mengen der Moleküle zu den Vesikeln gegeben und der zeitliche Verlauf der CF-Fluoreszenz detektiert (Abbildung 2.1). Nach Zugabe von Nisin stieg, wie erwartet, die CF-Fluoreszenz an, da die Lipid II-haltige Membran permeabilisiert wurde. Allerdings war der Anstieg für Nisin-AF647 etwas stärker. Zur vollständigen Permeation der Vesikel wurde abschließend Detergenz zugegeben. Dies führte bei beiden Proben zu einem Anstieg auf das gleiche Fluoreszenzniveau.

Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse *in vivo* und an Modellmembranen könnte die Ladung des AF647-Farbstoffes sein. Dieser ist dreifach negativ geladen und beeinflusst möglicherweise die Bindung von Nisin an die negativ geladene Bakterienmembran. Da aber generell eine Markierung am C-Terminus von Nisin seine Aktivität nicht zu vermindern scheint [143], wurde ein möglicher Einfluss des Farbstoffes nicht weiter untersucht.

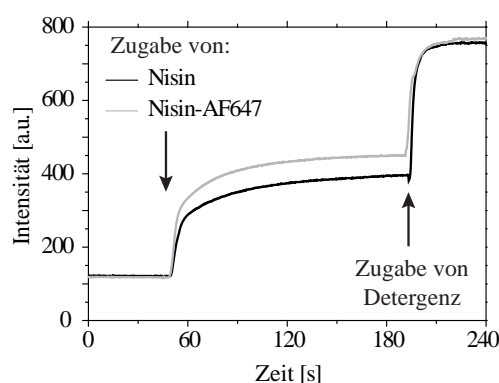


Abbildung 2.1: Zeitreihe des nisininduzierten Ausströmens von Carboxyfluorescein (CF) aus DOPC-LUVs, die 0,05 mol% Lipid II in ihrer Membran enthielten. Nach 50 s wurden Nisin und Nisin-AF647 mit einer jeweiligen Endkonzentration von 1 μM zugegeben. Das 100%ige Ausströmungslevel wurde durch Zugabe von Triton-X nach 200 s bestimmt.

2.1.2 Lipid II

Zur fluoreszenzmikroskopischen Detektion von Lipid II wurde das Molekül nach seiner Aufreinigung mittels esterfunktionalisierten Farbstoffen an seiner Lysingruppe markiert (Abschnitt 5.4.2). In anderen Arbeiten wurden bereits pyrenmarkiertes Lipid II zum Nachweis oligomerer Nisin-Lipid II-Komplexe [144] und NBD (7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol)-markiertes Lipid II zum Nachweis der nisininduzierten Segregation in Riesenvesikeln verwendet [137]. Hier wurden Lipid II-Atto488 und Lipid II-Atto647 zum einen für den qualitativen Nachweis der Aggregation zwischen Nisin und Lipid II verwendet und zum anderen wurde Lipid II-Atto647 für die quantitative Analyse der Lipid II-Diffusion mittels Einzelmolekülmikroskopie eingesetzt. Wie auch die Pyren- und NBD-Fluoreszenzfarbstoffe behinderten auch die Atto-Farbstoffe die Bindung von Nisin an Lipid II nicht. Für die Einzelmolekülmikroskopie wurde immer eine Mischung aus unmarkiertem und markiertem Lipid II verwendet, da die Konzentration der fluoreszenten Moleküle gering genug sein musste. Dabei betrug der Anteil von markiertem gegenüber unmarkiertem Lipid II nur $5 \cdot 10^{-4}$ mol%. Da ein so hoher Überschuss an natürlichem Lipid II vorhanden war, wurde der Einfluss des Farbstoffes auf die Messungen als sehr gering eingeschätzt.

Die Auswirkung einer Fluoreszenzmarkierung von Lipid II ließ sich nicht *in vivo* testen, da eine direkte Markierung der Lysingruppe des Moleküls mittels esterfunktionalisierten Farbstoffen in Bakterien nicht möglich ist. Eine *in vivo* Fluoreszenzmarkierung von Lipid II wurde bis jetzt nur nach Modifikation der Aminoseitenkette mit nicht-natürlichen D-Aminosäuren erreicht [145].

2.2 Nisinaktion *in vivo*

Um den Wirkmechanismus von Nisin zu verstehen, beschäftigten sich viele Studien mit dem Porenbildungsmechanismus von Nisin bei Bindung an Lipid II [100, 133, 144, 146, 142, 136]. Wie jedoch von Hasper und Mitarbeitern 2006 entdeckt wurde, bildete Nisin zudem große Aggregate in der Membran von Gram-positiven Bakterien wie *Bacillus subtilis* (Abbildung 1.16 B, [137]). Die Autoren vertraten in ihrer Publikation von 2006 die Auffassung, dass die Bildung von großen Nisinaggregaten einen alternativen Mechanismus zur Porenbildung darstellt. Eine Porenbildung führt zu einem Verlust des Membranpotentials, dem Einströmen von Schadstoffen und dem Verlust von Nährstoffen, eine Segregation von Lipid II inhibiert zudem die Zellwandbiosynthese und kann eine Fehllokalisation der Enzymmaschinerie, die zur Lipid II-Produktion und zum Einbau der Peptidoglykaneinheit benötigt wird, bewirken. Dies kann einen unvollständigen Schutz der Zellmembran und eine kaskadenartigen Störung weiterer Zellteilungsprozesse zur Folge haben.

Hasper und Mitarbeiter verwendeten in ihrer Publikation fixierte Bakterienzellen. Da spätestens durch die Fixierung der Zelltod bewirkt wird, geben die publizierten Bilder keinen einwandfreien Aufschluss über die biologische Relevanz der Bildung von großen Nisinaggregaten. Um die Relevanz der Aggregation für die antimikrobielle Aktivität von Nisin zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Zellen von *Bacillus subtilis* mit 1,5 μM Nisin-AF647 inkubiert. Nach 5-minütiger Inkubation wurden die Zellen auf einem Agarosekissen immobilisiert (Abschnitt 5.8.1, Abbildung 5.4) und 30 Minuten lang mikroskopisch abgebildet. Um tote Zellen zu detektieren, waren in dem Agarosekissen 50 nM SYTOX Green enthalten. Dieser Farbstoff kann eine intakte Membran nicht überqueren. Dringt er durch beschädigte Membranen in die Bakterien ein, bindet er spezifisch an Nukleinsäuren und beginnt zu fluoreszieren. Der Farbstoff wird deshalb als Indikator von toten Bakterienzellen verwendet [147].

Mit dieser Versuchsanordnung ließ sich die Bildung von Nisinaggregaten mit der Beschädigung der Zellmembran und dem Zelltod der Bakterien korrelieren. Abbildung 2.2 zeigt exemplarische Aufnahmen von inkubierten und immobilisierten Zellen. Es wurde keine homogene Bindung des Peptids an die Membran, sondern eine unmittelbare Aggregation beobachtet. Es entstanden Aggregate unterschiedlicher Intensität und Ausdehnung. Trotz einiger Ausnahmen schien ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Aggregation und dem induzierten Zelltod zu bestehen. Kleine Aggregate führten nicht zu einer Permeation von Zellen. Dagegen bewirkte die Bildung von mittelgroßen und großen Aggregaten zumeist ein Eindringen von SYTOX Green. Die Fluoreszenzintensität von SYTOX Green war sehr verschieden und gibt wahrscheinlich Aufschluss über den Grad der Zellbeschädigung. Es ist anzunehmen, dass bei zunehmender Beschädigung der Membran mehr Farbstoff in die Zellen eindringen konnte und zu einer erhöhten SYTOX Green-Fluoreszenz führte.

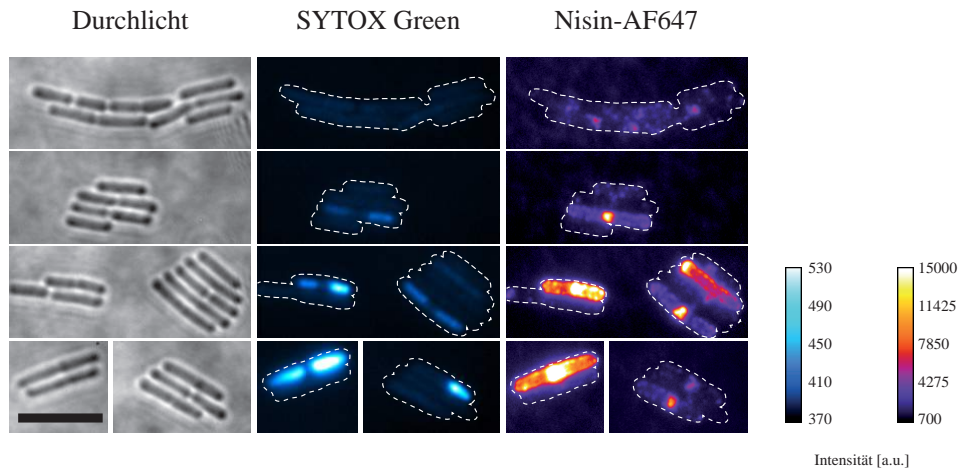


Abbildung 2.2: Exemplarische Bilder von *Bacillus subtilis*-Zellen, die 5 Minuten mit 1,5 μM Nisin-AF647 inkubiert und anschließend auf Agarosekissen immobilisiert wurden (1 % Agarose mit 50 nM SYTOX Green). Bilder wurden 15-25 Minuten nach Zugabe mit Nisin aufgenommen. Links sind Durchlichtbilder der Zellen, in der Mitte die Fluoreszenz von SYTOX Green und rechts die Fluoreszenz von Nisin-AF647 gezeigt. Die Legenden der Farbtabelle, die zur Visualisierung der Fluoreszenzintensitäten verwendet wurden, befinden sich rechts neben den Bildern. Maßstabsbalken 10 μm .

Um den qualitativen Eindruck der Korrelation zwischen Aggregatbildung und Membranpermeation zu verifizieren und zu quantifizieren, wurden für 80 Bakterienzellen jeweils die maximalen SYTOX Green- und des Nisin-AF647-Fluoreszenzintensitäten F_{max} je Zelle bestimmt (Abschnitt 5.9.7) und in Abbildung 2.3 gegeneinander aufgetragen.

Die Auftragung zeigt, dass erst ab einem gewissen Grenzwert der Nisin-AF647-Signalintensität auch ein Anstieg des SYTOX Green-Signals aufgrund einer abnehmenden Integrität der Zellmembran zu beobachten war. Es wurde angenommen, dass die gemessenen, maximalen Nisin-AF647-Intensitäten den größten Aggregaten der Zellen entsprechen, da die Fluoreszenzintensität von der Zahl der aggregierten Nisin-AF647-Moleküle abhängt. Somit ist es wahrscheinlich, dass eine Mindestgröße der Nisinaggregate nötig war, um die Zellmembran ernsthaft zu beschädigen. Zwischen der Aggregatgröße über dem Grenzwert und dem Grad der Beschädigung, also der Intensität des SYTOX Green-Signals, war keine eindeutige Korrelation mehr zu erkennen. Mit weiter zunehmender Nisin-AF647-Intensität war jedoch bei allen Zellen ein Eindringen des Farbstoffs zu beobachten.

Die Bildung von Nisinaggregaten wurde besonders in der Mitte und an den Polen der Zelle beobachtet. Der Grund dafür ist die inhomogene Verteilung von Lipid II in der Bakterienmembran. Während der exponentiellen Wachstumsphase befinden sich die Lipid II-Moleküle in Bereichen der aktiven Zellwandbiosynthese, nämlich am Septum in der Mitte der Zellen und Regionen der Zellelongationen an den Zellpolen, wo sich die ineinandergreifenden Proteinkomplexe der Lipid II-Synthese befinden.

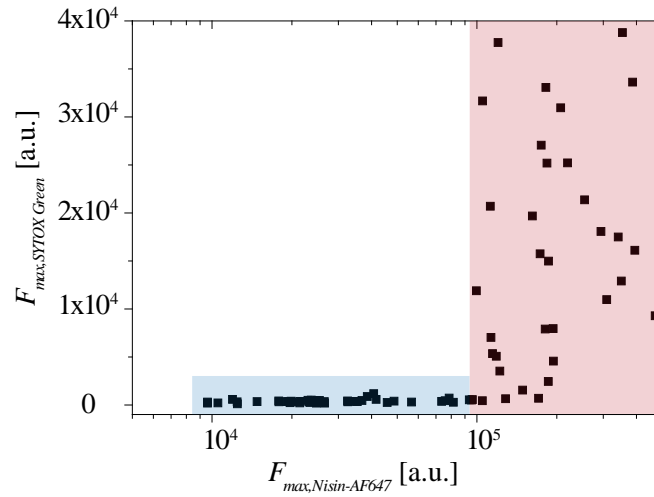


Abbildung 2.3: Auftragung der maximalen SYTOX Green-Fluoreszenz je Zelle als Funktion der maximalen Nisin-AF647 Fluoreszenz derselben Zelle. Es wurden 80 Bakterienzellen aus drei verschiedenen Experimenten analysiert. In blau ist der Bereich intakter Zellmembranen markiert. Erst ab einer bestimmten Nisin-AF647-Intensität ist ein Eindringen von SYTOX Green aufgrund einer Beschädigung der Membran zu beobachten (rot markierter Bereich).

2.3 Bindung von Nisin an GUV-Membranen

Die Interaktion von fluoreszenzmarkiertem Nisin-AF647 mit GUV-Membranen unterschiedlicher Zusammensetzung wurde mittels konfokaler Laserrastermikroskopie untersucht. Dazu wurden Schnitte durch die äquatoriale Ebene der Vesikel in einem Zeitintervall von 3-5 Minuten nach Zugabe der GUVs zu der Nisinlösung aufgenommen.

Wie in Abschnitt 1.1.1 beschrieben, bestehen bakterielle Membranen hauptsächlich aus neutralen PE- und negativ geladenen PG-Lipiden. Aus präparativen Gründen konnten GUVs mit einer ähnlichen Zusammensetzung nicht hergestellt werden, da die intrinsische Krümmung der PE-Lipide und die Ladung der PG-Lipide die Riesenvesikel ab einer Konzentration von 20-30 mol% instabil machen [38]. Stattdessen wurden zur Präparation hauptsächlich PC-Lipide verwendet (Abbildung 2.4). Diese Phospholipide sind neutral und besitzen eine zylindrische Form. Die aus ihnen präparierten GUVs sind stabil und nach außen neutral. In diese Matrix wurden 20 mol% PG-Lipide integriert, um den Einfluss der negativen Ladung auf die Nisininteraktion zu beobachten. Da Nisin eine positive Gesamtladung von +4 besitzt, wurde eine Bindung an negativ geladene Membranen aufgrund von attraktiven elektrostatischen Wechselwirkungen erwartet.

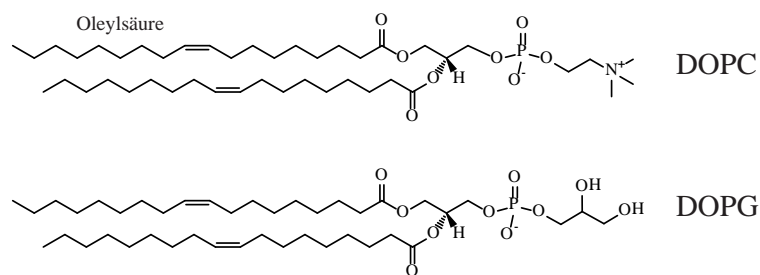


Abbildung 2.4: Strukturen der verwendeten Phospholipide. Oben: 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC), unten: 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (DOPG).

Die Bindung an Membranen, die verschiedene an Baktoprenolkomponenten enthielten, wurde ebenfalls charakterisiert. Dazu wurden jeweils 0,2 mol% der Baktoprenolkomponenten C₅₅-P, C₅₅-PP, Lipid I und Lipid II (Abbildung 2.5) in die PC-GUVs integriert. Lipid I und Lipid II wurden dabei von der Arbeitsgruppe Sahl zur Verfügung gestellt. Die Konzentration von 0,2 mol% wurde verwendet, um eine ähnliche Konzentration der Baktoprenolkomponenten wie in Bakterienmembranen herzustellen. In diesen beträgt der Anteil an Lipid II maximal 1 mol% [149].

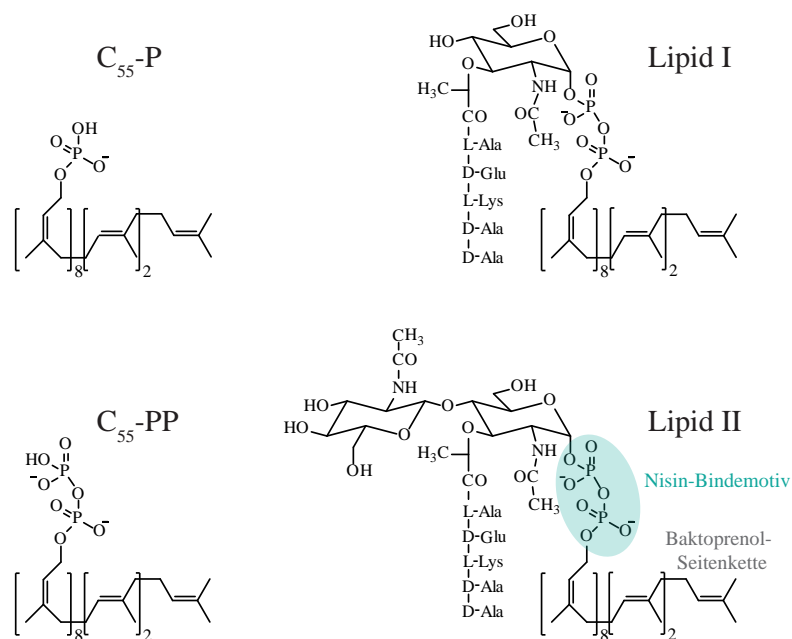


Abbildung 2.5: Lipidstrukturen der verwendeten Baktorenolkomponenten C₅₅-P, C₅₅-PP, Lipid I und Lipid II dargestellt. Die Baktorenolseitenkette besteht aus elf Isopreneinheiten und besitzt eine hohe Flexibilität. Von der Pyrophosphatgruppe des Lipid II-Moleküls ist bekannt, dass sie Nisin als Bindemotiv dient [148].

2.3.1 Ladungsinduzierte Wechselwirkungen

Um die ladungsinduzierten Wechselwirkungen von Nisin mit Lipiddoppelschichten zu charakterisieren, wurden neutrale und negativ geladene GUVs mit 1,5 μM Nisin-AF647 inkubiert. Bei neutralen GUVs, bestehend aus DOPC, verblieb Nisin-AF647 in der Lösung (Abbildung 2.6 A) und es wurde keine Bindung an die Membran beobachtet. Dagegen fand eine schnelle Bindung von Nisin-AF647 innerhalb der ersten beiden Minuten an DOPG-haltige GUVs statt (Abbildung 2.6 B).

Hier zeigte sich an der Membran ein helles Fluoreszenzsignal wohingegen keine Fluoreszenz von der umgebenden Lösung ausging. Wurden die anionischen GUVs in eine Nisinlösung gegeben, die außerdem noch Ionen (Na_2SO_4) enthielt, war die Akkumulation von Nisin an die Membran stark reduziert (Abbildung 2.6 C). Dies war an einem deutlich schwächeren Fluoreszenzsignal an der GUV-Oberfläche und einem höheren Hintergrundsignal in der umgebenden Lösung zu erkennen. Offensichtlich wurden in Anwesenheit von Ionen die Ladungen sowohl der Membran als auch des Peptids abgeschirmt. Dadurch wurde die attraktive elektrostatische Wechselwirkung zwischen den negativ geladenen GUVs und dem positiv geladenen Nisin mit seiner Gesamtladung von +4 abgeschwächt.

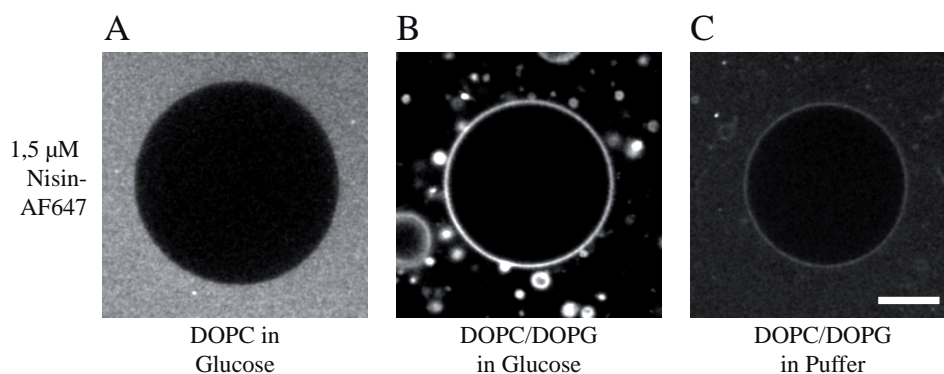


Abbildung 2.6: Ladungsinduzierte Interaktion von Nisin-AF647 mit GUVs hergestellt aus den Phospholipiden DOPC und DOPG. Die konfokalen Bilder zeigen die Membranbindung bei Zugabe von 1,5 µM Nisin-AF647 zu (A) DOPC-Membranen in 250 mM Glucoselösung, (B) DOPC/DOPG (80/20)-Membranen in 250 mM Glucoselösung und (C) DOPC/DOPG (80/20)-Membranen in einer salzhaltigen Glucoselösung (125 mM Glucose, 30 mM MES, 35 mM Na₂SO₄). Die Bilder wurden 5 Minuten nach Zugabe von Nisin aufgenommen. Maßstabsbalken 20 µm.

2.3.2 Spezifische Wechselwirkungen

Wie schon von Hasper und Mitarbeitern [137] gezeigt, führt die spezifische Bindung von Nisin an Lipid II-haltige Membranen nicht zu einer homogenen Verteilung von Nisin, sondern zu einer Aggregation. Um zu überprüfen, ob die Nisinaggregate an Lipid II-haltigen Membranen tatsächlich sowohl Nisin als auch Lipid II enthielten, wurde grünfluoreszierendes Lipid II-Atto488 in DOPC-Membranen integriert und die Fluoreszenz von Nisin-AF647 und Lipid II-Atto488 separat in zwei Kanälen detektiert (Abbildung 2.7). Ohne Zugabe von Nisin-AF647 war Lipid II-Atto488 homogen in der Membran der Vesikel verteilt. Dagegen bildeten sich nach Zugabe von Nisin-AF647 Aggregate. Eine Kolkalisationsanalyse zeigte, dass die Aggregate sowohl Nisin als auch Lipid II enthielten. Damit wurde eindeutig nachgewiesen, dass die spezifische Bindung von Nisin an Lipid II zur schnellen Bildung von Nisin-Lipid II-Aggregaten in der Membran führt.

Danach wurde der Einfluss von konkurrierenden elektrostatischen Wechselwirkungen sowohl in der Lipidmatrix als auch in der umgebenden Lösung analog zu Abschnitt 2.3.1 untersucht. Als Referenz dazu wurde die Aggregation in neutralen, Lipid II-haltigen DOPC-Membranen detektiert, in denen nur die spezifischen Wechselwirkungen mit Lipid II eine Membranbindung von Nisin bewirken können. Wie schon in Abbildung 2.7 gezeigt, riefen diese spezifischen Wechselwirkungen eine Segregation von Nisin-AF647 zu hellen, fluoreszierenden Aggregaten in der Membran hervor (Abbildung 2.8 A). Bei der zusätzlichen Anreicherung der GUV-Membran mit 20 mol% negativ geladenem DOPG wurde sowohl eine Aggregatbildung als auch eine durch elektrostatische Wechselwirkungen hervorgerufene

ne Bindung von Nisin-AF647 beobachtet (Abbildung 2.8 B). In Gegenwart von Ionen in der umgebenden Lösung waren die elektrostatischen Wechselwirkungen reduziert. Allerdings war immer noch eine starke Aggregatbildung zu erkennen (Abbildung 2.8 C). Also fand trotz der Gegenwart von negativ geladenen Lipiden, die um die Bindung von Nisin konkurrierten, und von Ionen in Lösung, die die Ladung von Nisin abschirmten, eine starke Aggregatbildung von Nisin statt (Abbildung 2.8).

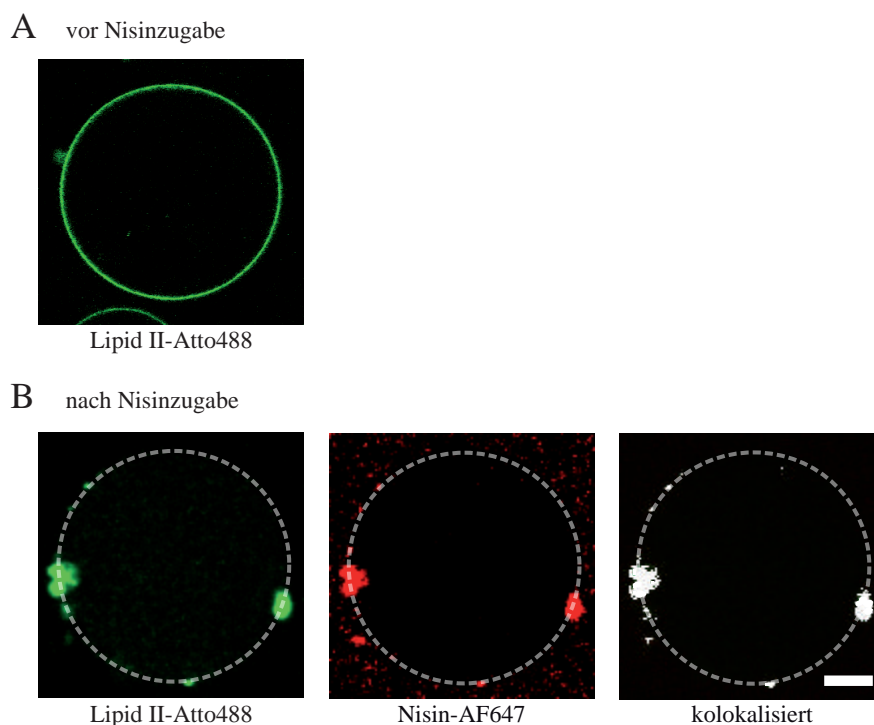


Abbildung 2.7: Aggregation von Lipid II-Atto488 und Nisin-AF647. Membranverteilung von 0,2 mol% Lipid II-Atto488 vor (A) und nach (B) Zugabe von 0,2 μ M Nisin-AF647 (B). Für beide Aufnahmen wurden die gleichen Mikroskopeinstellungen verwendet. Zur besseren Darstellung wurden sie aber unterschiedlich kontrastiert, da die Lipid II-Atto488-Aggregate deutlich heller waren als die homogen verteilten Lipid II-Atto488-Moleküle. Für das Experiment wurden die GUVs zu einer 250 mM Glucoselösung ohne und mit 0,2 μ M Nisin-AF647 gegeben. Kolokalisation der Lipid II-Atto488- und Nisin-AF647-Moleküle innerhalb der Aggregate wurde durch Analyse mittels eines ImageJ-Moduls 5.9.3 nachgewiesen und durch weiße Pixel angezeigt. Die GUVs wurden 5 Minuten nach Zugabe von Nisin abgebildet. Maßstabsbalken 10 μ m.

Die Aggregatbildung als Zeichen der spezifischen Wechselwirkung von Nisin-AF647 wurde ebenfalls an GUVs untersucht, welche die anderen Baktoprenolkomponenten des Zellwandbiosyntheszyklus, C_{55} -P, C_{55} -PP und Lipid I, enthielten. Für C_{55} -P-haltige DOPC-GUVs war fast keine Aggregatbildung zu beobachten, wohingegen sie an Lipid I-haltigen Membranen vergleichbar mit der an Lipid II-haltigen GUVs war. Im qualitativen Vergleich befand sich die Tendenz zur Aggregatbildung für C_{55} -PP-haltige DOPC-Membranen zwischen der bei C_{55} -P und Lipid II beobachteten.

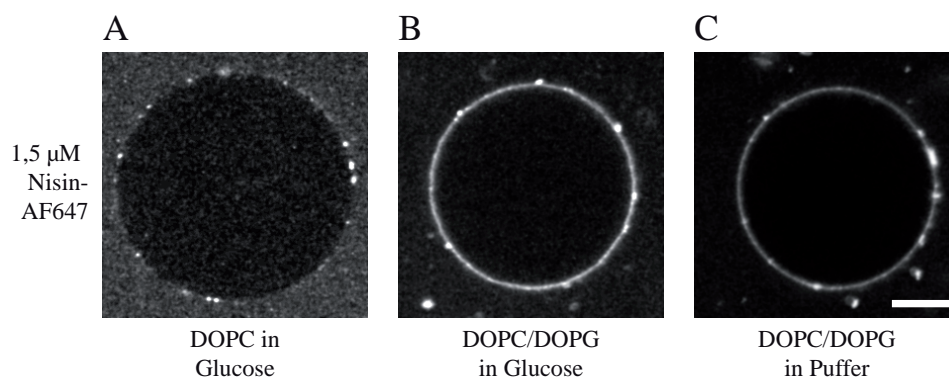


Abbildung 2.8: Spezifische Wechselwirkungen von Nisin-AF647 mit Lipid II-haltigen Phospholipid-GUVs. Die GUVs enthielten jeweils 0.2 mol% Lipid II. Die Zugabe von 1,5 μ M Nisin-AF647 führte immer zu einer Aggregation. Gezeigt sind (A) DOPC-Membranen in 250 mM Glucoselösung, (B) DOPC/DOPG (80/20)-Membranen in Glucoselösung und (C) DOPC/DOPG (80/20)-Membranen in salzhaltiger Glucoselösung (125 mM Glucose, 30 mM MES, 35 mM Na_2SO_4). Die GUVs wurden 5 Minuten nach Zugabe von Nisin abgebildet. Maßstabsbalken 20 μ m.

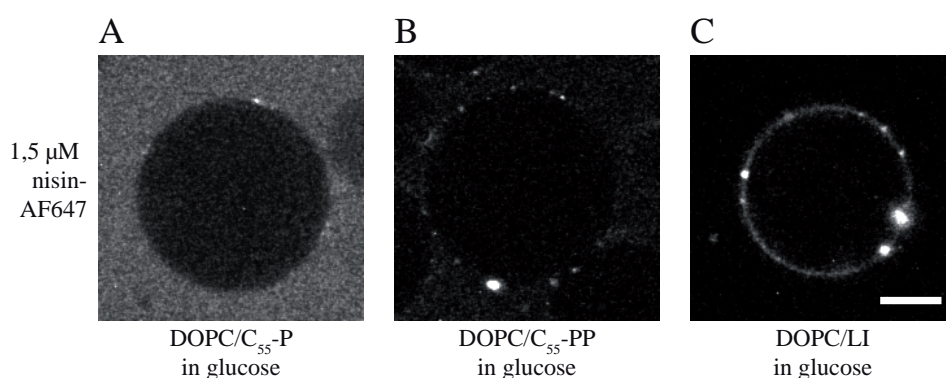


Abbildung 2.9: Spezifische Wechselwirkungen von Nisin-AF647 mit baktoprenolhaltigen Phospholipid-GUVs. Die GUVs enthielten jeweils 0.2 mol% der Baktoprenolkomponenten (A) C₅₅-P, (B) C₅₅-PP und (C) Lipid I. Die Bindung von 1,5 μ M Nisin-AF647 an die GUVs in 250 mM Glucoselösung wurde 5 Minuten nach der Nisinzugabe abgebildet. Maßstabsbalken 20 μ m.

2.4 Aggregatbildung zwischen Nisin und Baktoprenolkomponenten

Die Aggregation von Nisin an den GUV-Membranen ist offensichtlich ein charakteristisches Merkmal der spezifischen Interaktion mit Lipid II. Wie in Abbildung 2.9 gezeigt, war sie aber auch mit anderen Baktoprenolkomponenten der Zellwandbiosynthese zu beobachten. Um das Aggregationsverhalten von Nisin in Abhängigkeit vom Baktoprenolbindungspartner quantitativ zu analysieren, wurden zum einen die Intensitäten der Nisinaggregate als Referenz der Aggregatgröße als auch die Dichte der Aggregate in einem definierten Membranabschnitt als Referenz der Wahrscheinlichkeit zur Aggregatbildung bestimmt. Im Vergleich dazu wurden diese Charakteristika auch für reine Phospholipidmembranen ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in diesem Abschnitt beschrieben.

Da der Einsatz von 1,5 μM Nisin-AF647 (Abschnitt 2.3.2) nicht nur zu einer starken Aggregation an Lipid II-haltigen GUVs, sondern auch nach 10 Minuten Inkubationszeit zu der vollständigen Zerstörung vieler Vesikel führte, wurde zur quantitativen Analyse der Aggregation die Konzentration von Nisin-AF647 so weit wie möglich reduziert. Durch die Sensitivität des Detektors des verwendeten Laserrastermikroskops limitiert wurde eine Konzentration von 0,2 μM Nisin-AF647 eingesetzt. Diese Konzentration liegt im oberen Bereich der minimalen Hemmkonzentration [150].

Für die quantitative Analyse wurden zunächst 2-dimensionale Querschnitte durch die äquatoriale Ebene der GUVs aufgenommen. Wie in Abschnitt 2.3 gezeigt, waren für die Art der Wechselwirkung von Nisin mit GUV-Membranen verschiedene Bindungsmuster charakteristisch. So band Nisin-AF647 gar nicht an neutrale DOPC-GUVs, an negativ geladenen Membranen wurde eine homogene Bindung beobachtet und eine starke Aggregation fand statt, wenn ein spezifischer Bindungspartner wie Lipid II vorhanden war. Das bedeutet, dass die Intensitätsprofile von Nisin-AF647 entlang der GUV-Membranen je nach Bindungspartner sehr unterschiedlich waren und deshalb Informationen über die Art der Wechselwirkungen enthielten.

Um die Membranintensitätsprofile quantitativ zu analysieren, wurden die ringförmigen Membranprofile zunächst linearisiert. Diese Profile sind in Abbildung 2.10 A für die drei oben genannten Beispiele gezeigt. Dann wurden die Intensitätswerte der Pixel entlang der GUV-Membran bestimmt und als Histogramm aufgetragen (Abbildung 2.10 B). Für die neutralen Membranen verteilten sich die Intensitätswerte ähnlich einer Normalverteilung um den Hintergrundwert (blau), da keine Fluoreszenz von Nisin-AF647 an der Membran, und damit keine Bindung, beobachtet wurde. Eine Gauß-ähnliche Verteilung erhielt man ebenfalls bei der Analyse des Membranprofils von Nisin-AF647 an negativ geladene GUVs (grün). Die Verteilung verschob sich aber zu höheren Intensitätswerten, da im Gegensatz

zu reinen DOPC-GUVs Nisin-AF647 aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen an die Membran gebunden war. Eine andere Situation lag bei der spezifischen Bindung von Nisin-AF647 an Lipid II-haltige Membranen vor. Ein Teil der Nisinmoleküle war homogen gebunden, was in etwa zu einer Normalverteilung der Intensitätswerte führte. Aber zusätzlich gab es einige sehr hohe Intensitätswerte, die außerhalb der Normalverteilung lagen (rot). Diese Werte entsprachen den Signalen an den Stellen, an denen Nisin-AF647 zu Aggregaten akkumuliert war.

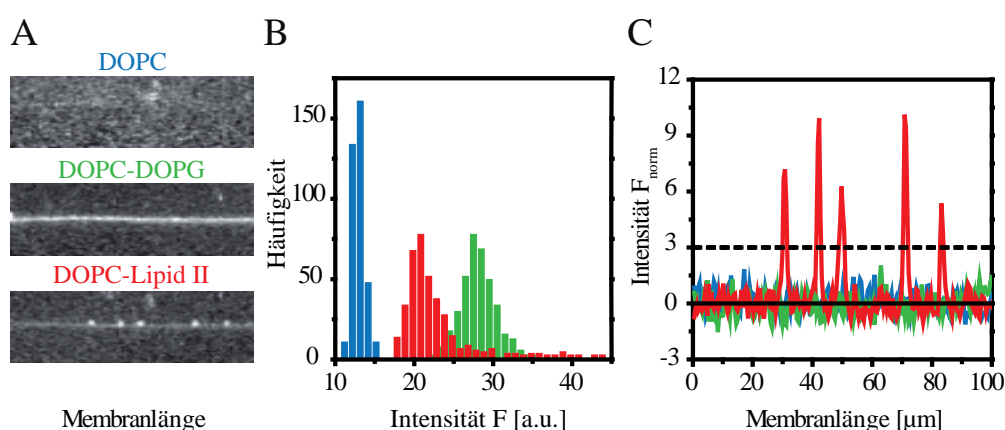


Abbildung 2.10: Analyse der Intensitätsprofile von Nisin-AF647 entlang GUV-Membranen unterschiedlicher Zusammensetzung. (A) Linearisierte Profile des Nisin-AF647-Fluoreszenzsignals entlang DOPC-, DOPC/DOPG- und DOPC/Lipid II-GUVs nach 5-minütiger Inkubation. (B) Darstellung der Fluoreszenzintensitätswerte der Linienprofile aus (A) in Form von Histogrammen. (C) Graphische Darstellung der normierten Intensitätswerte entlang der Linienprofile aus (A). Nisin-AF647-Aggregate zeigten signifikant höhere Intensitätswerte (rote Kurve) als die Basislinienintensität (schwarze Linie, durch die Normierung als Nullwert definiert). Die gestrichelte Linie zeigt den Schwellenwert ($3\cdot\sigma$) zur Selektion der signifikanten Aggregatintensitäten an.

Als Maß für die Aggregationstendenz wurden die Größe und die Liniendichte der Aggregate für die verschiedenen Baktoprenolkomponenten bestimmt. Um den Aggregaten Intensitätswerte zuzuordnen, wurden die Werte der linearisierten Intensitätsprofile wie in Abschnitt 5.9.2 beschrieben normiert. Dies ergab Intensitätsprofile, die nun vergleichbar analysiert werden konnten (Abbildung 2.10 C). Nur die Intensitätswerte der Aggregate ragten als Peaks über die fluktuierenden Intensitätswerte heraus. Als Auswahlkriterium wurde ein Schwellenwert von $3\cdot\sigma$ festgelegt. Innerhalb dieses Intervalls lagen mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,7 % alle normalverteilten Werte. Somit wurden bei Annahme einer Normalverteilung mit großer Wahrscheinlichkeit die Werte selektiert, die nicht normalverteilt waren.

Die Aggregatgröße drückte sich in der Höhe der Intensitätswerte an den Stellen der Aggregate aus; je höher diese Werte waren, umso mehr Farbstoffe und damit Nisinmoleküle waren in diesem Bereich akkumuliert. Die Aggregatdichte wurde berechnet, indem die Häufigkeit der Peakwerte in einem Längenintervall der Membran bestimmt wurde. Es wurden die mittleren Aggregatgrößen und -dichten von mindestens 15 GUVs für jede Membranzusammensetzung ermittelt. Zur Analyse der Intensitätsprofile wurde ein MATLAB-Softwareprogramm verwendet (Abschnitt 5.9.2). Die Aggregatbildung wurde für DOPC-GUVs quantifiziert, die mit jeweils 0,2 mol% der Baktorenolkomponenten C₅₅-P, C₅₅-PP, Lipid I und Lipid II angereichert waren. Zum Vergleich für den Einfluss der elektrostatischen Wechselwirkung auf die Aggregatbildung, wurden außerdem negativ geladene GUVs, die 20 mol% DOPG enthielten, untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.11 dargestellt.

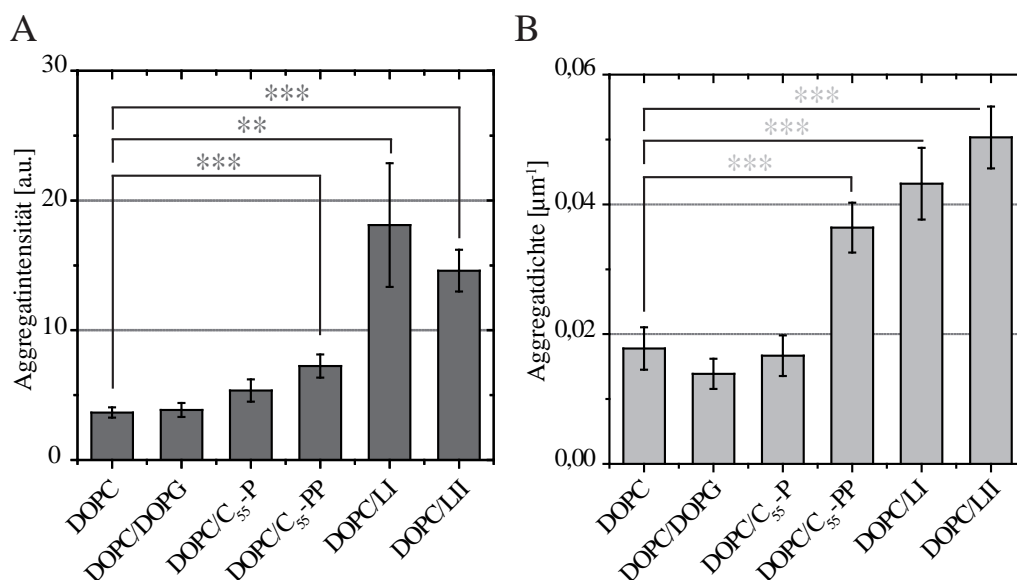


Abbildung 2.11: Mittlere Peakintensitäten (A) und mittlere Peakdichten (B) verschiedener Phospholipid- und Baktorenolmischungen. Der Standardfehler ist durch die Fehlerbalken angegeben. Es wurden mindestens 15 GUVs für jede Membranzusammensetzung analysiert (DOPC: N = 24, DOPC/DOPG: N = 20, DOPC/C₅₅-P: N = 19, DOPC/C₅₅-PP: N = 28, DOPC/Lipid I: N = 15, DOPC/Lipid II: N = 21). Signifikanz wurde mittels eines unabhängigen, zwei-seitigen t-Testes bestimmt. Bei vorhandener Signifikanz wurde dies mit Sternchen gekennzeichnet (***) für $p < 0,005$ und ** für $p < 0,01$).

Die höchste Aggregatdichte wurde für Lipid II-haltige GUVs beobachtet. Allerdings war die Dichte für Lipid I- und C₅₅-PP-haltige GUVs ähnlich hoch. Deutlich niedriger war hingegen die Dichte für C₅₅-P-haltige, neutrale und negativ geladene GUVs. In Lipid II- und Lipid I-haltigen GUVs wurden die größten Aggregatintensitäten beobachtet. Interessanterweise waren die für die beiden Membranzusammensetzungen bestimmten und gemittelten Peakwerte von vergleichbarer Höhe. Dies bedeutet, dass im Mittel ungefähr die gleiche Anzahl an Nisinmolekülen in diesen Aggregaten akkumuliert war. Die Größe der C₅₅-PP-haltigen

Aggregate war signifikant kleiner. Ein signifikanter Größenunterschied wurde ebenfalls zwischen C₅₅-PP- und C₅₅-P-haltigen Aggregaten beobachtet. Die Aggregate an C₅₅-P-haltigen Membranen waren nur unwesentlich größer als der Referenzwert für neutrale und negativ geladenen Membranen, an denen keine spezifischen Wechselwirkungen von Nisin-AF647 auftraten. Für alle GUV-Zusammensetzungen, für die nur unspezifische Wechselwirkungen auftreten konnten, wurden nur kleine Aggregate mit geringer Membrandichte beobachtet.

2.5 Messung der Lipidmobilität mittels Lichtblattmikroskopie

Durch Einzelmolekülverfolgung kann die Bewegung von einzelnen Molekülen in einem Medium, z. B. einer Membran, untersucht werden. Durch die Analyse von Molekültrajektorien können verschiedene Bewegungsformen wie aktiver Transport, begrenzte oder freie Diffusion identifiziert werden. Die freie Diffusion kann anhand eines Diffusionskoeffizienten charakterisiert werden. Handelt es sich um Moleküle, die sich in einer homogenen Lipiddoppelschicht bewegen, kann der Zusammenhang zwischen Diffusionskoeffizient und Partikelradius durch die Gleichungen 1.2 und 1.3 beschrieben werden.

In dieser Arbeit wurde von dem Zusammenhang zwischen Molekülradius und Diffusionskoeffizient Gebrauch gemacht, um den Aggregationsprozess zwischen Nisin und Lipid II zu charakterisieren. Da einzelne Lipid II-Moleküle einen geringeren Radius besitzen als Nisin-Lipid II-Aggregate, weisen einzelne Lipid II-Moleküle eine höhere Mobilität auf als in Aggregaten komplexierte Lipid II-Moleküle. Die Messung der Diffusionskoeffizienten von fluoreszenzmarkierten Lipid II-Molekülen lieferte somit einen direkten Aufschluss über den Grad der Aggregation und der durch Interaktion zwischen Nisin und Lipid II initiierte Aggregationsprozess war direkt nachvollziehbar. Die Messungen der Lipidmobilität wurden mittels Lichtblattmikroskopie (selective plane illumination microscopy, SPIM) durchgeführt (Abbildung 2.12).

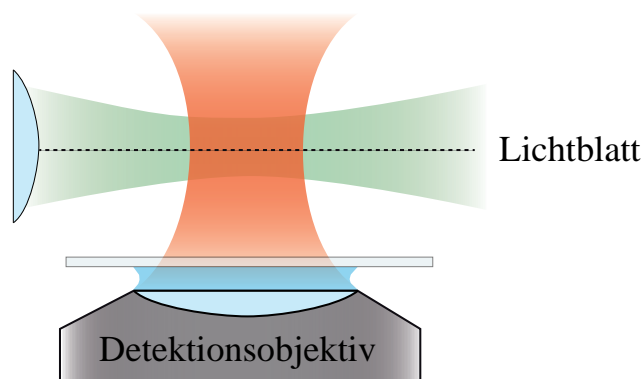


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Lichtblattfluoreszenzmikroskopie. Durch die Beleuchtung der fokalen Ebene der Probe mit einem dünnen Lichtblatt (1-10 μm [151]) senkrecht zu der Detektionsrichtung wird ein optischer Schnitteffekt erreicht. Nur in der beleuchteten Schicht wird Fluoreszenz angeregt und detektiert.

Bei der Lichtblattmikroskopie wird die Probe mit einem dünnen Lichtblatt beleuchtet und die Fluoreszenz senkrecht zur Beleuchtung detektiert. Durch diese Art der Beleuchtung und Anordnung wird die Hintergrundfluoreszenz im Vergleich mit der Epi-Fluoreszenz-

mikroskopie deutlich reduziert. Dieser intrinsische optische Schnitteffekt erlaubt es, einzelne Moleküle mit einem sehr hohen Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SRV) zu beobachten [152]. Der Aufbau des verwendeten Mikroskops wurde von Dr. Jörg Ritter und Dr. Jan-Hendrik Spille entworfen, realisiert und charakterisiert [153, 151].

Es wurden GUVs bestehend aus POPC-Lipiden (Abbildung 2.13) verwendet, die 0,2 mol% Lipid II enthielten. Als Indikatoren für die POPC- und Lipid II-Mobilität wurden mit Atto647 markierte POPE- und Lipid II-Moleküle verwendet. Zur Markierung der Lipide wurde der Farbstoff kovalent an ihre Kopfgruppen gekoppelt (Abschnitte 5.4.1 und 5.4.2). Markierte Lipide wurden in einer sehr hohen Verdünnung von 10^{-6} mol% beigefügt, sodass die Fluoreszenzsignale mit ausreichender Separation detektiert werden konnten. Somit war nur eines von 200.000 Lipid II-Molekülen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und der Einfluss des Farbstoffes auf das Aggregationsverhalten war vernachlässigbar.

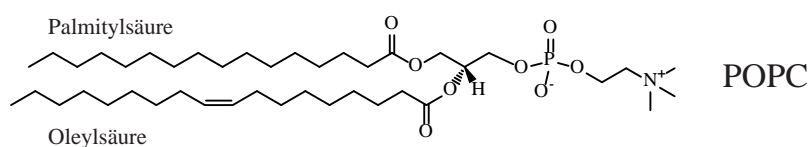


Abbildung 2.13: Molekülstruktur des Phospholipids 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POPC), das für die Präparation der GUVs verwendet wurde.

Als Probenkammer wurde eine maßangefertigte Glasküvette verwendet (Abbildung 5.5). Die Proben wurden wie in Abschnitt 5.8.3 beschrieben präpariert. Die Probenkammer wurde mit einem Glasdeckel verschlossen, um die Bewegungen der GUVs durch Konvektion weitgehend zu verhindern. Zur Filmaufnahme wurde die Kammer so im Lichtblatt positioniert, dass nur die obere Membrankappe der GUVs beleuchtet wurde (Abbildung 2.14). Für jede experimentelle Bedingung wurden sechs Proben präpariert, in denen jeweils 3-5 GUVs vermessen wurden. Die verwendeten Aufnahmeparameter sind in Abschnitt 5.8.3 des Methodenteils aufgeführt.

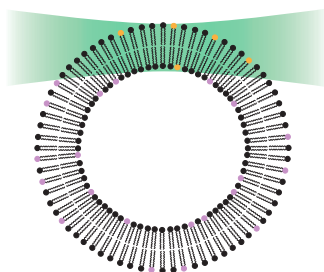


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung der Lichtblattfluoreszenzmikroskopie an GUVs. Die GUVs wurden in eine maßangefertigte Küvette gegeben, die bis zum Rand mit Flüssigkeit gefüllt und mit einem Glasdeckel abgedeckt wurde. Dadurch wurden Bewegungen der GUVs durch Konvektion größtenteils verhindert. Die Probenkammer wurde so positioniert, dass das Lichtblatt die Membrankappe der GUVs beleuchtete und somit die Bewegung der einzelnen Lipide nur in dieser Schicht detektiert wurde.

Bei Verwendung eines stabilen und hellen Farbstoffes wie Atto647 wird das Signal-zu-Rausch-Verhältnis und damit auch die Genauigkeit der Lokalisierung erhöht [151]. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wurde mittels $SRV = \frac{I_{Signal}}{\sigma_{Hintergrund}}$ mit der Amplitude des Signals I_{Signal} und dem Hintergrundrauschen $\sigma_{Hintergrund}$ bestimmt. Das SRV der Signale war sehr hoch (Abbildung 2.15) und lag im Bereich von 20-30. Es besteht ein Zusammenhang zwischen SRV und Lokalisierungsgenauigkeit, da die Lokalisierungsgenauigkeit hauptsächlich von der detektierten Photonenzahl des Emitters abhängt. Sie ist aber auch durch die Pixelgröße, das Detektorrauschen, die Bewegung des Emitters sowie die Stabilität des Mikroskopaufbaus limitiert. Für einen typischen Diffusionskoeffizienten von $D = 5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ergab sich mit den für die Messungen verwendeten Kameraeinstellungen (Abschnitt 5.8.3) eine Lokalisierungsgenauigkeit von $\sigma_x = \approx 20 \text{ nm}$ (Abschnitt 5.9.4).

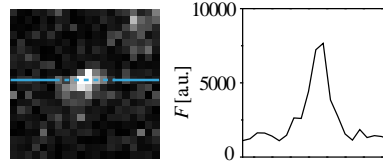


Abbildung 2.15: Signal eines Atto647-Farbstoffes und das zugehörige Intensitätsprofil mit einem typischen Signal-zu-Rausch-Verhältnis von ≈ 27 .

Nach ihrer Lokalisierung wurden die Fluoreszenzsignale zu Trajektorien verknüpft (Abbildung 2.16, Abschnitt 5.9.4). Die GUV-Membran ist eine Schicht von nur $\approx 4 \text{ nm}$ Dicke [154], somit ist die Bewegung der Lipidmoleküle auf die kugelförmige GUV-Oberfläche beschränkt. Bei einem typischen Diffusionskoeffizienten von $D = 5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ wäre die in einer planaren Ebene zurückgelegte Strecke $x(\Delta t) = \sqrt{4 \cdot D \cdot \Delta t}$. Bei einer verwendeten Bildrate von 100 Hz (Abschnitt 5.8.3) hätte sich das beobachtete Lipid somit um $x = 447,21 \text{ nm}$ zwischen zwei Aufnahmen bewegt. Da die GUV-Oberfläche gekrümmt ist, wäre die eigentlich zurückgelegte Strecke b jedoch größer. Über folgenden Zusammenhang lässt sich die Strecke b berechnen: $b = 2R_{GUV} \cdot \sin^{-1} \frac{x}{2R_{GUV}}$. Damit ergibt sich $b = 447,25 \text{ nm}$ bei einem GUV-Radius von $R_{GUV} = 10 \mu\text{m}$. Die Differenz der Werte für x und b beträgt damit nur 0,01 %. Bei großem Durchmesser der GUVs ($> 10 \mu\text{m}$), d.h. bei kleiner Membrankrümmung, lässt sich die Bewegung der Lipide auf der Membrankappe der GUVs also sehr gut als zweidimensionale Diffusion in einer Ebene beschreiben.

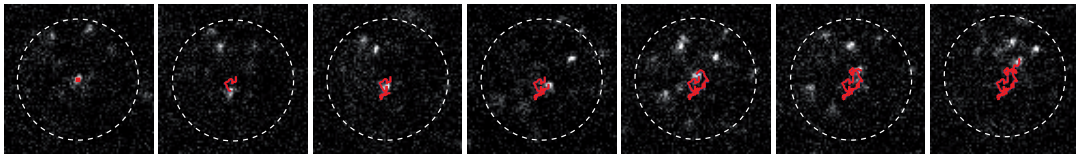


Abbildung 2.16: Die Sequenz zeigt Aufnahmen eines diffundierenden Lipid II-Atto647-Moleküls. In rot ist die Bewegungstrajektorie des Moleküls dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt die beleuchtete Membrankappe des GUVs an. Die Filme wurden mit einer inversen Bildrate von 10 ms aufgenommen. Das Zeitintervall zwischen den hier abgebildeten Aufnahmen beträgt jeweils 100 ms.

2.6 Die Dynamik des Nisin-Lipid II-Aggregationsprozesses

2.6.1 Analyse der mittleren Diffusionskoeffizienten

Um den Aggregationsprozess von Nisin und Lipid II zu charakterisieren, wurde die Lipid II-Diffusion ohne Zusatz von Nisin und als Funktion der Zeit nach Zugabe von Nisin gemessen. Wie in Abschnitt 2.3.2 gezeigt, wurde durch die Zugabe von Nisin der Aggregationsprozess von Lipid II in Gang gesetzt. Es wurden zwei verschiedene Nisin-zu-Lipid II-Konzentrationsverhältnisse untersucht. Das Verhältnis entsprach für die niedrigere Nisinkonzentration von 0,2 μM einem Wert von 4:1 und für die höhere Konzentration von 1,5 μM einen Wert von 30:1. Die Konzentration von 0,2 μM lag im Bereich der minimalen Hemmkonzentration [150].

Um die zeitliche Veränderung der mittleren Diffusionskoeffizienten nach Zugabe von Nisin zu untersuchen, wurden die Trajektorien 5-minütigen Zeitintervallen zugeteilt und für jedes Zeitintervall wie in 5.9.4 beschrieben ein MSD-Plot erstellt. In Abbildung 2.17 sind die MSD-Plots für die vier sich ergebenden Zeitintervalle getrennt für die beiden Nisinkonzentrationen dargestellt. (A) zeigt die Kurven für die Zugabe von 0,2 μM Nisin und (B) für die Zugabe von 1,5 μM Nisin. Zum Vergleich sind in grau die MSD-Plots für die Diffusion einzelner Lipid II-Atto647-Moleküle ohne Zugabe von Nisin gezeigt. Durch lineare Anpassung der Kurven konnte nach Gleichung 5.4 aus der Steigung der MSD-Plots der Diffusionskoeffizient bestimmt werden. Die Standardfehler der einzelnen MSD-Werte waren aufgrund der großen Datenmenge (≥ 10.000 Datenpunkte zur Berechnung eines MSD-Wertes) sehr gering ($\leq 0,02 \mu\text{m}^2$) und sind in der Darstellung nicht zu erkennen, da sie kleiner als die eingezeichneten Datenpunkte waren. Der Fehler der Diffusionskoeffizienten wurde aus der linearen Anpassung wie in Abschnitt 5.9.4 beschrieben erhalten.

Für die Referenzmessung ohne Zugabe von Nisin ergab sich für den Diffusionskoeffizienten von Lipid II-Atto647 $D_{MSD} = 5,5 \pm 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Die Werte für D_{MSD} nach Zugabe von Nisin sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Für beide Nisinkonzentrationen wurde eine kontinuierliche Reduktion der Lipid II-Mobilität beobachtet. Das wurde erwartet, da Nisin die Aggregation von Lipid II induziert und dadurch eine Änderung der Lipid II-Mobilität hervorruft. Der Effekt war stärker ausgeprägt für die höhere Nisinkonzentration. Bei Zugabe von 0,2 μM Nisin wurde der Wert von $D_{MSD} = 5,3 \pm 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ nach 5-minütiger Inkubation kontinuierlich bis auf einen Wert von $D_{MSD} = 4,6 \pm 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ nach 25 Minuten Inkubation reduziert. Dieser Wert war bei der Inkubation mit 1,5 μM Nisin bereits nach 5 Minuten erreicht und reduzierte sich nach 25 Minuten Inkubation weiter auf einen Wert von $D_{MSD} = 4,3 \pm 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

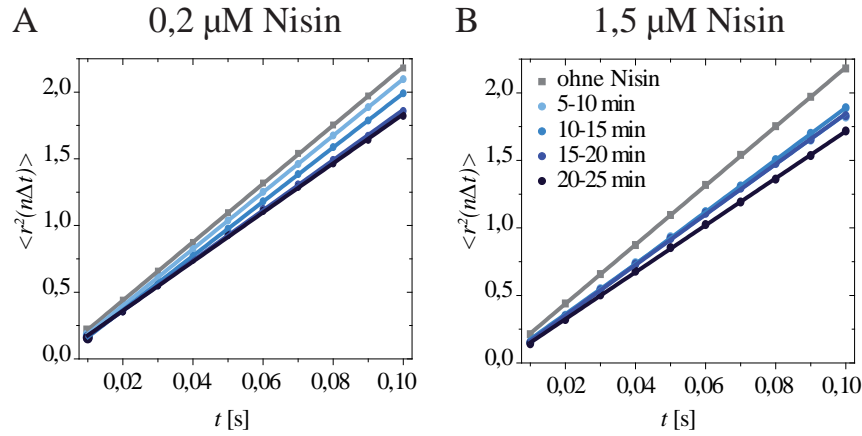


Abbildung 2.17: MSD-Kurven nach Zugabe von (A) 0,2 μM Nisin und (B) 1,5 μM Nisin. Die MSD-Kurven quantifizieren die Diffusion von Lipid II-Atto647 abhängig von der Inkubationszeit und des Nisin-zu-Lipid II-Konzentrationsverhältnisses. MSDs wurden jeweils für 5-minütige Intervalle berechnet. Mit zunehmender Inkubationszeit nimmt die Steigung der linearen Kurven ab (von hell- zu dunkelblau). In grau ist zum Vergleich die MSD-Kurve für die Diffusion einzelner Lipidmoleküle ohne Zugabe von Nisin gezeigt. Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern und sind kleiner als die Datenpunkte.

Zeitintervall	$D_{MSD} [\mu\text{m}^2/\text{s}]$	$D_{MSD} [\mu\text{m}^2/\text{s}]$
	für 0,2 μM Nisin	für 1,5 μM Nisin
5-10 min	5,3	4,6
10-15 min	5,1	4,8
15-20 min	4,7	4,7
20-25 min	4,6	4,3
Standardfehler $\leq 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$		

Tabelle 2.1: Zeitabhängige Mobilität von Lipid II-Atto647-Molekülen in POPC-GUVs, die 0,2 mol% Lipid II enthielten, nach Zugabe von 0,2 μM und 1,5 μM Nisin.

2.6.2 Verteilung der Diffusionskoeffizienten

Ein detaillierteres Bild des Aggregationsprozesses ergibt sich, wenn man anstatt der mittleren Diffusionskoeffizienten die Verteilung der Diffusionskoeffizienten betrachtet. Eine solche Verteilung reflektiert auch die Größenverteilung der mobilen Lipid II-Aggregate und liefert damit mehr Informationen über den Aggregationszustand unter bestimmten Bedingungen. Um eine Verteilung der Diffusionskoeffizienten zu erhalten, wurde diese für jede einzelne Trajektorie wie in Abschnitt 5.9.4 beschrieben bestimmt. Dafür wurde aus den Positionen jeder Trajektorie ein MSD-Plot berechnet und mittels linearer Anpassung nach Gleichung 5.4 der Diffusionskoeffizient berechnet. Es wurde zunächst überprüft, welche Filterkriterien für die Datenanalyse angewendet werden sollten. Eine lineare Anpassung wird überhaupt erst ab einer Mindestzahl von drei Datenpunkten sinnvoll, also ab einer Trajektorienlänge von mindestens drei Sprüngen. Da sich aus diesen sehr kurzen Trajektorien aber nur sehr wenige Datenpunkte für die MSD-Plots gewinnen lassen, waren diese durch entsprechend geringe Anpassungsgüten gekennzeichnet (Abbildung 2.18 A). Damit zusammenhängend ergab sich ein sehr hoher Anteil an negativen Diffusionskoeffizienten für die sehr kurzen Trajektorien (Abbildung 2.18 B). Negative Diffusionskoeffizienten ergaben sich aus einer negativen Steigung der MSD-Plots, sind physikalisch aber unsinnig. Als Filterkriterium wurde daher eine Mindestzahl von fünf Sprüngen je Trajektorie festgelegt. Damit wurde zwar etwa ein Drittel der gesamten Datenmenge verworfen (Abbildung 2.18 C), aber der Anteil der negativen Diffusionswerte auf etwa 1 % reduziert.

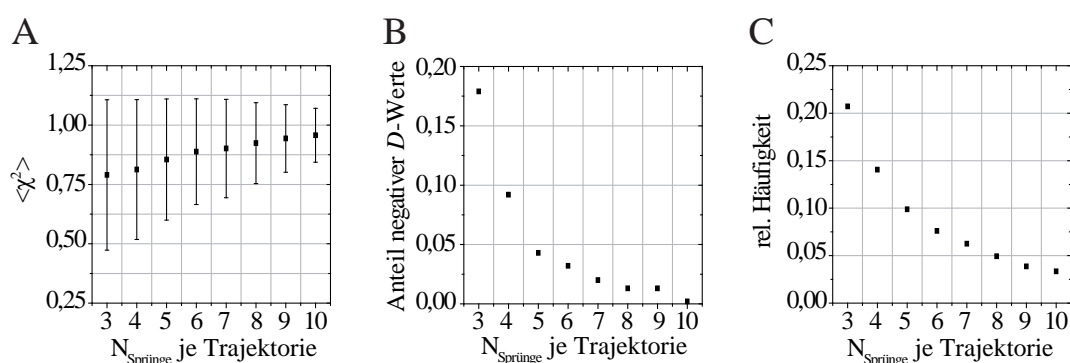


Abbildung 2.18: Die Abbildung zeigt den Einfluss der Trajektorienlänge auf die mittlere Anpassungsgüte (Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen) (A) und auf den Anteil an negativen Diffusionskoeffizienten (B). In (C) ist das Histogramm der Trajektorienlänge gezeigt. Der Erstellung der Graphen lagen alle 23.365 Trajektorien zugrunde, die aus den Messungen der Lipid II-Mobilität ohne und mit Zusatz von Nisin ermittelt wurden.

Die mit dem genannten Filterkriterium bestimmten kumulativen Verteilungen der Diffusionskoeffizienten sind in Abbildung 2.19 nach Zugabe von 0,2 μM und 1,5 μM Nisin in Abhängigkeit der Inkubationsdauer gezeigt. Natürlich sind alle Trajektorien, die die Basis der Verteilungen bilden, stochastischer Natur. Deswegen erwartet man auch bei einer

einheitlichen Größe der beobachteten Partikel eine starke Variation der D -Werte. Dies war anhand der grauen Kurve deutlich zu sehen. Diese Kurve entspricht der Verteilung der Diffusionskoeffizienten von einzelnen Lipid II-Atto647-Molekülen ohne Zugabe von Nisin. Diese Kurve kann aber als Referenz verwendet werden, um anhand der Unterschiede zu den anderen Kurven nach Zugabe von Nisin den Aggregationsprozess zu charakterisieren.

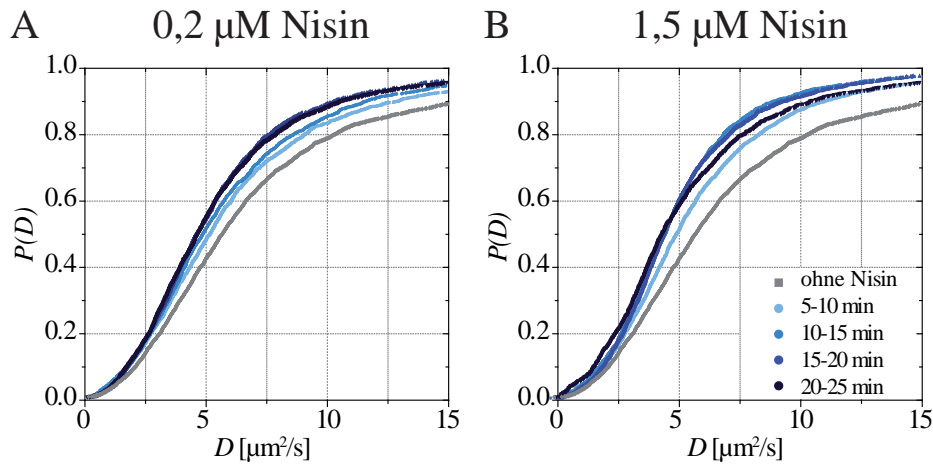


Abbildung 2.19: Kumulative Verteilungen der Lipid II-Atto647 Diffusionskoeffizienten nach Zugabe von (A) 0,2 μM und (B) 1,5 μM Nisin. Mit zunehmender Inkubationszeit verschieben sich die Kurven nach links d. h. zu kleineren Diffusionskoeffizienten. Der Effekt ist stärker ausgeprägt für die höhere Nisinkonzentration. Die Bereiche der Kurven bei $D = 5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ sind rot hervorgehoben (s. Text). Zum Vergleich zeigen die grauen Kurven die Verteilung der Diffusionskoeffizienten ohne Zugabe von Nisin.

Nach Zugabe von Nisin wurden deutliche Unterschiede zur Referenz beobachtet. Wie nach der Bestimmung der mittleren Diffusionskoeffizienten erwartet, zeigten die Verteilungen mit zunehmender Inkubationszeit eine Verschiebung hin zu kleineren Diffusionskoeffizienten. Das weist darauf hin, dass die Zugabe von Nisin zu einer stetigen Zunahme der Trajektorien mit kleineren Diffusionskoeffizienten führte. Diese Beobachtung kann mit der zunehmenden, nisininduzierten Aggregation der Lipid II-Moleküle erklärt werden. Wie in den MSD-Plots schon erkennbar, war ein Unterschied für die beiden Nisinkonzentrationen vorhanden. So war die Verschiebung der Verteilung für das höhere Nisin-zu-Lipid II-Verhältnis deutlicher sichtbar. Bei der Inkubation mit 0,2 μM Nisin nahm der Anteil der Diffusionskoeffizienten mit $D \leq 5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ stetig auf 57,6 % zu. Im Vergleich dazu lag der Anteil ohne Zugabe von Nisin bei 45,0 %. Nach 20 Minuten Inkubation wurde keine Veränderung der Verteilung mehr beobachtet (Abbildung 2.19 A).

Die Inkubation mit 1,5 μM Nisin führte dagegen bereits nach 10 Minuten zu einer Reduzierung des Anteils $D \leq 5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ auf 54,8 %. Nach 15 Minuten war dieser Anteil auf 61,3 % angestiegen und veränderte sich anschließend kaum noch. Im Gegensatz zu der geringeren Nisinkonzentration veränderte sich aber zusätzlich nach 20 Minuten Inkubation noch der Anteil der Moleküle mit geringeren Diffusionskoeffizienten. Es erhöhte sich der Anteil mit $D \leq 2,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ deutlich von 11,3 % ohne Nisinzugabe auf 18 % (Abbildung 2.19 A).

2.6.3 Berechnung repräsentativer Diffusionskoeffizienten

Vor dem Hintergrund der bekannten Nisin-Lipid II-Aggregation kann man spekulieren, ob die Unterschiede, die in den Verteilungen der Diffusionskoeffizienten im Bereich der niedrigeren Mobilitäten für die beiden Nisinkonzentrationen beobachtet wurden, auf eine Bildung von größeren Aggregaten bei einem höheren Überschuss von Nisin hindeuten. Da allerdings auch die Verteilung der Diffusionskoeffizienten für Lipid II-Atto647 ohne Zugabe von Nisin D -Werte in diesem Bereich besitzt, kann keine einfache Relation für die Ermittlung von Aggregatgrößen angewendet werden. Deshalb wurden anhand von Verteilungen der quadratischen Abstände und Sprungweitendiagrammen die Daten parametrisiert und repräsentative Diffusionskoeffizienten ermittelt. Diese wurden verwendet, um eine Veränderung der Mobilitätsbeiträge zu quantifizieren und Aggregatgrößen zu bestimmen.

Für jeden der acht Datensätze, die für die vier Zeitintervalle und jeweils zwei Nisinkonzentrationen erstellt wurden, wurden zunächst die Sprungweitenverteilungen und die kumulativen Verteilungen der Abstandsquadrate berechnet. Es wurde eine globale Anpassung der Gleichungen 5.7 und 5.8 an die Datensätze durchgeführt, um die repräsentativen Diffusionskoeffizienten zu erhalten. Die Gleichungen gelten für die zweidimensionale Diffusion und berücksichtigen mehrere Diffusionskoeffizienten D_i . Damit kann zwischen verschiedenen Diffusionsspezies unterschieden werden. Die Parameter A_i geben die jeweiligen relativen Häufigkeiten an, mit denen die Diffusionskoeffizienten D_i repräsentiert waren. Um die Korrelation der Parameter A_i und D_i zu reduzieren, wurde die Anzahl der freien Parameter verringert. Dafür wurden für alle acht Verteilungen gemeinsame Diffusionskoeffizienten D_i gesucht, während die relativen Anteile A_i optimiert wurden.

Die optimale Anzahl der Mobilitätsfraktionen A_i kann durch das korrigierte Bestimmtheitsmaß R^2 abgeleitet werden. Das korrigierte Bestimmtheitsmaß ist definiert als $\bar{R}^2 = 1 - \frac{QSR}{GSQ} \cdot \frac{N-1}{N-K-1}$ mit QSR = Quadratsumme der Residuen, GSQ = Gesamtsumme der Quadrate, N = Anzahl der Datenpunkte und K = Anzahl der unabhängigen Variablen. \bar{R}^2 nähert sich dem Wert 1 für gute Anpassungsmodelle und berücksichtigt nicht nur die Anpassungsgüte, sondern auch die Komplexität des Modells, die von der Anzahl der freien Parameter abhängt.

Die Kurvenanpassung des gesamten Datensatzes wurde mit unterschiedlich vielen Mobilitätsfraktionen A_i ($\sum_{i=1}^n A_i = 1$, $n = 1, 2, 3, 4$ oder 5) durchgeführt, sodass sich eine Gesamtzahl an freien Parametern von $K = 11$ (8 A_i -Werte + 3 D_i -Werte), $K = 19$ ($2 \cdot 8$ A_i -Werte + 3 D_i -Werte) und so weiter ergab. Die \bar{R}^2 -Werte sind in Abbildung 2.20 A in Abhängigkeit der Anzahl n der Mobilitätsfraktionen gezeigt. Eine deutliche Verbesserung der Anpassung des gesamten Datensatzes wurde bis zu einer Anzahl von drei Fraktionen erreicht; mit einer weiteren Steigerung der Anzahl n wurde nur noch eine minimale Erhöhung des \bar{R}^2 Wertes erzielt (Abbildung 2.20 A).

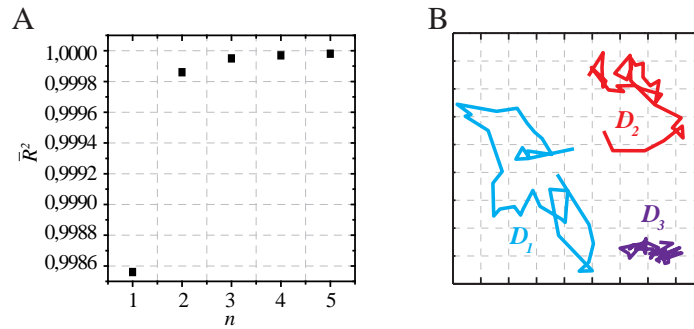


Abbildung 2.20: (A) Abhängigkeit des korrigierten Bestimmtheitsmaßes von der Anzahl n der Mobilitätsfraktionen. (B) Beispieltrajektorien für die ermittelten Diffusionskoeffizienten D_1 (einzelne Lipid II-Moleküle), D_2 (kleine Lipid II-Aggregate) und D_3 (große Lipid II-Aggregate).

Unter Berücksichtigung von drei Mobilitätsfraktionen wurden die drei Diffusionskonstanten $D_1 = 5,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_2 = 2,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $D_3 = 0,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mit einem Standardfehler von jeweils $\pm 0,01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ bestimmt. Die Analyse der Sprungweiten lieferte dieselben Werte wie die Analyse der kumulativen Verteilungen der Abstandsquadrate. Beispielhaft sind in Abbildung 2.20 B drei Trajektorien mit den entsprechenden Diffusionskoeffizienten gezeigt. Anhand dieser Trajektorien erkennt man, dass Lipid II-Moleküle mit einem Diffusionskoeffizienten von D_2 und D_3 in gleicher Zeit deutlich geringere Distanzen zurücklegten als Lipid II-Moleküle mit einem Diffusionskoeffizienten D_1 . Wie später noch in Abschnitt 2.7.1 beschrieben wird, war der Diffusionskoeffizient D_1 dem Diffusionskoeffizienten $D_{LII} = 5,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$, der für einzelne Lipid II-Atto647-Moleküle ohne Zugabe von Nisin bestimmt wurde, sehr ähnlich. Deswegen wurden die Fraktionen mit D_1 freien Lipid II-Molekülen zugeordnet. D_2 war gegenüber D_1 um die Hälfte und D_3 gegenüber D_1 sogar um eine Größenordnung reduziert. Als Ursache für die Mobilitätsverringern der Lipid II-Atto647-Moleküle wurde ihre Komplexbildung in Nisin-Lipid II-Aggregaten angenommen. Die zu D_2 und D_3 korrespondierenden Lipid II-Aggregate werden im Folgenden als kleine und große Aggregate bezeichnet.

Die Mobilitätsanteile der drei Diffusionskoeffizienten veränderten sich abhängig von der Inkubationszeit und der Nisinkonzentration (Abbildung 2.21). Die relative Anzahl der einzelnen Lipid II-Moleküle mit D_1 nahm mit der Zeit ab, wobei dies bei der hohen Nisinkonzentration von $1,5 \mu\text{M}$ schneller und stärker der Fall war. Gleichzeitig war ein Anstieg

des Beitrags der zweiten Fraktion mit dem Diffusionskoeffizienten D_2 zu beobachten. Der dritte Diffusionskoeffizient D_3 war nur für die längste Inkubationszeit und höchste Nisin-konzentration präsent. Der Anteil betrug 5 %.

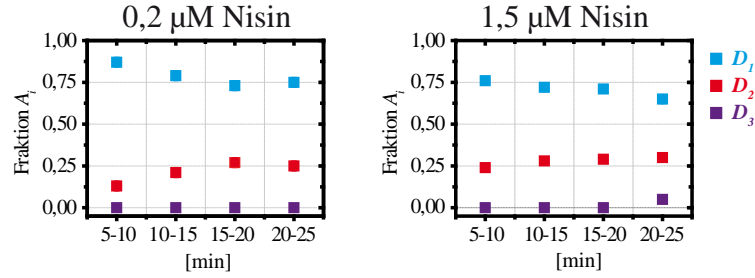


Abbildung 2.21: Dargestellt sind die relativen Anteile der Fraktionen A_1 , A_2 und A_3 . Fehlerbalken (Standardfehler $\leq 0,02$) sind kleiner als die Datenpunkte.

Eine anschaulichere Darstellung als die kumulativen Verteilungen der Abstandsquadrate liefern die Sprungweitenverteilungen. An diese Verteilungen wurde mit den ermittelten D -Werten eine globale Anpassung der Gleichung 5.7 vorgenommen. Das Ergebnis ist in Abbildung 2.22 gezeigt. Die Mobilitätsanteile sind entsprechend der zugehörigen D -Werte eingefärbt. Daran ist zu erkennen, dass die kleinen Aggregate (rote Kurven für D_2) schon 5 Minuten nach Zugabe von 0,2 µM Nisin zu beobachten waren und sich die großen Aggregate (violette Kurve für D_3) nur wie oben beschrieben bei längerer Inkubation (> 20 Minuten) mit der höheren Konzentration von 1,5 µM Nisin bildeten.

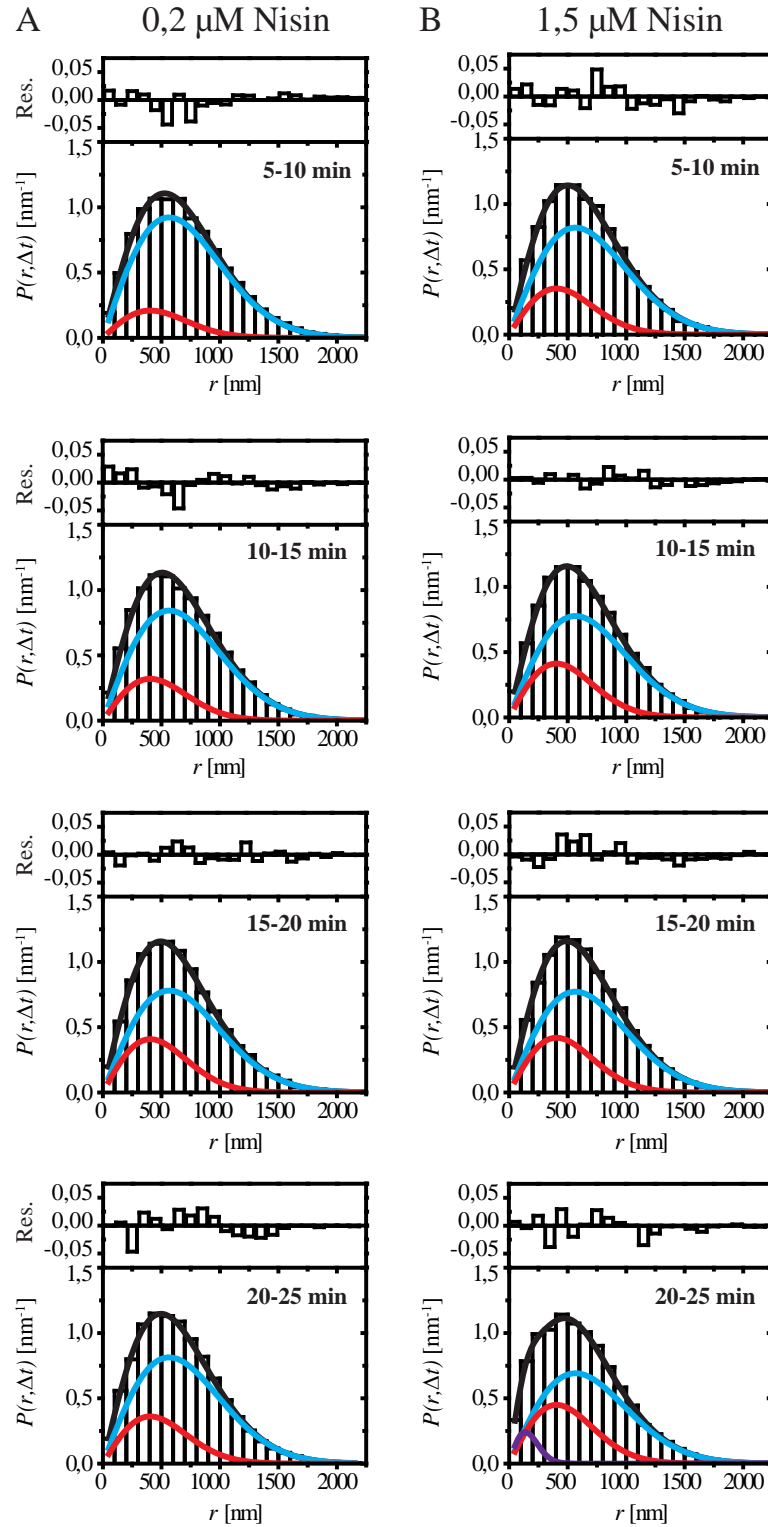


Abbildung 2.22: Die Abbildung zeigt den globalen Fit (schwarze Kurven) an die zeitabhängigen Sprungweitenhistogramme nach Zugabe von (A) 0,2 μM und (B) 1,5 μM Nisin. Die Anpassung ergab die Werte $D_1 = 5,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (blaue Kurven), $D_2 = 2,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (rote Kurven) und $D_3 = 0,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (violette Kurve). Über den Sprungweitenhistogrammen sind die jeweiligen Residuen, die sich aus der globalen Anpassung ergaben, dargestellt.

2.7 Größenabschätzung der Nisin-Lipid II-Aggregate

Mit den entsprechenden Modellen für die Diffusion von Molekülen in Membranen lassen sich aus gemessenen Diffusionskoeffizienten Membranviskositäten und Partikelradien berechnen (Abschnitt 1.2.1). Um die Viskosität der in den Experimenten verwendeten Membranen zu bestimmen, wurden Referenzmessungen mit Lipiden bekannter Größe durchgeführt. Den repräsentativen Diffusionskoeffizienten, die für die Mobilität von Lipid II nach Zugabe von Nisin mit einem globalem Fit ermittelt wurden, konnten dann entsprechende Aggregatradien zugeordnet werden. Mit einem einfachen geometrischen Modell wurde anschließend die Anzahl der Lipid II-Moleküle pro Aggregat abgeschätzt.

2.7.1 Berechnung der Membranviskosität und der Lipidradien

Um die Viskosität der Membran zu bestimmen, wurde als erstes die Diffusion von POPE-Atto647 in POPC-Membranen jeweils ohne und mit Zusatz von 0,2 mol% Lipid II analysiert. POPE-Atto647 wurde als Indikator der Membranmobilität eingesetzt, da angenommen wurde, dass die Mobilität von POPE-Atto647 hauptsächlich von den Lipidketten bestimmt wird. Da diese dieselben wie bei POPC sind, sollte POPE-Atto647 das Diffusionsverhalten der Lipide in der Membran gut wiedergeben. Der Einfluss des Farbstoffes wurde als vernachlässigbar angesehen, da er über eine Kohlenwasserstoffkette aus fünf Kohlenstoffatomen mit der Kopfgruppe des POPE-Moleküls verknüpft war. Deshalb sollte er in der umgebenden Lösung verbleiben, die eine deutlich niedrigere Viskosität als die Membran besaß und somit die Bewegung des Lipids nicht behinderte. Durch die Mobilitätsmessung sowohl in reinen POPC-Membranen als auch in Lipid II-haltigen POPC-Membranen wurde überprüft, ob der Zusatz von Lipid II die Mobilität der Lipide beeinflusst. Die Werte der Diffusionskoeffizienten wurden mittels MSD-Analyse (D_{MSD}) sowie der Auswertung der kumulativen Verteilung der Abstandsquadrate (D_{CD}) als auch der Sprungweitenverteilung (D_{JD}) erhalten. Die Anpassungskurven sind in Abbildung 2.23 gezeigt, die ermittelten Werte sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Das Saffman-Delbrück-Modell [62] gilt für kleine in der Membran enthaltene Moleküle wie Lipide. Unter Verwendung dieses Modells (Gleichung 1.2) wurden aus den D_{CD} -Werten folgende Membranviskositäten berechnet: $\mu_{m,POPC} = 0,106 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ für POPC-Membranen und $\mu_{m,LII} = 0,093 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ für POPC Membranen mit Zusatz von 0,2 mol% Lipid II. Als Literaturwerte wurden dabei verwendet: für die Membrandicke h von POPC-Membranen $h = 3,98 \text{ nm}$ [154], für die Viskosität der 250 mM Zuckerlösungen $\mu_w \approx 1,2 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ bei 20 °C [155] und für den Radius von POPE-Atto647 der aus der Fläche pro Lipid berechnete Wert für POPC $R_{POPC} = 0,45 \text{ nm}$ [154].

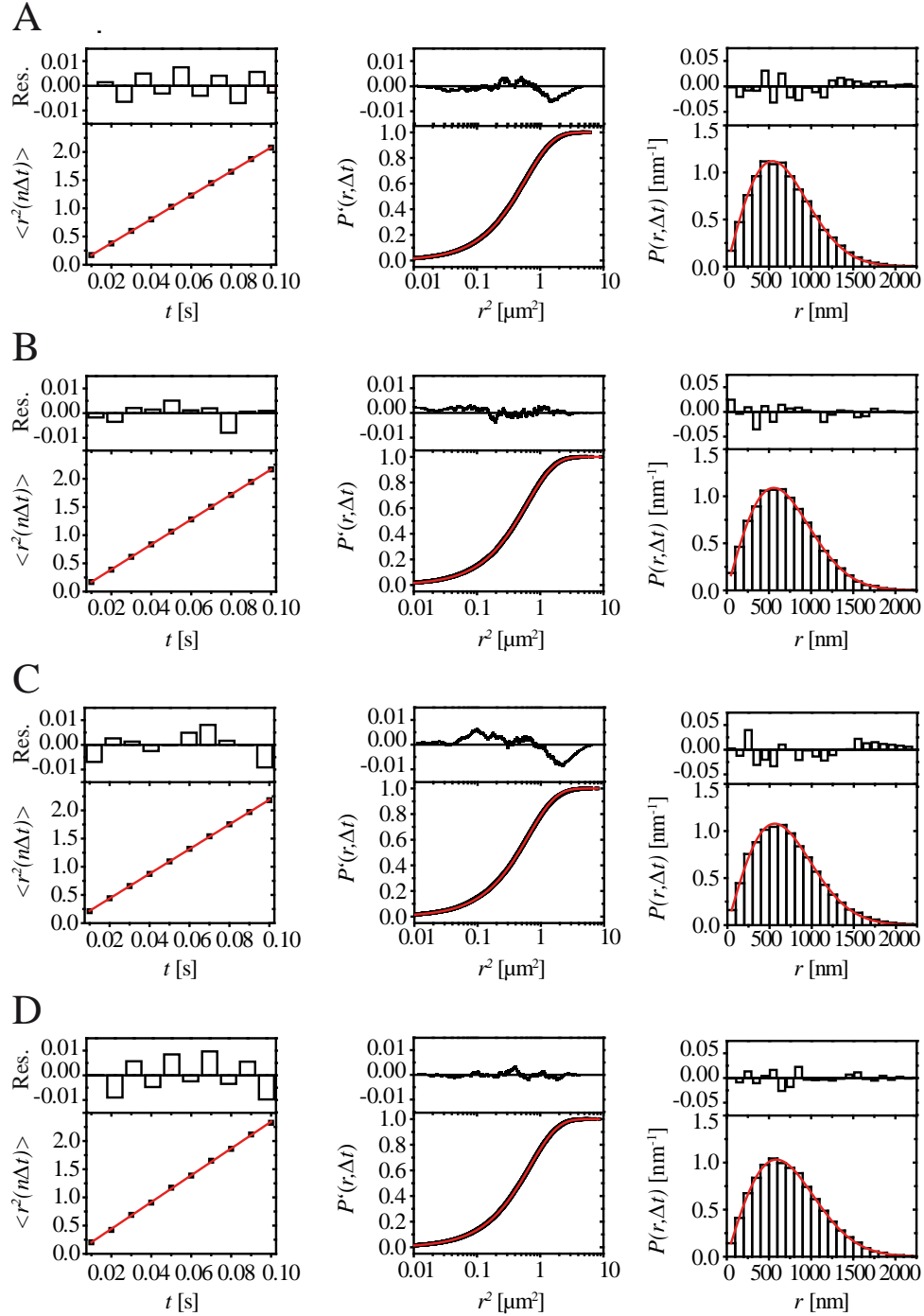


Abbildung 2.23: Anpassung der MSD-Kurven (links), kumulativen Verteilungen der Abstandsquadrate (Mitte) und Sprungweitenverteilung (rechts) für (A) Lipid II-Atto647 und (B) POPE-Atto647 in POPC-GUVs, und (C) Lipid II-Atto647 und (D) POPE-Atto647 in POPC-GUVs mit Zusatz von 0,2 mol% Lipid II. Datenpunkte sind in schwarz und Anpassungskurven in rot gezeigt. Siehe Tabelle 2.2 für die Werte der ermittelten Diffusionskoeffizienten.

Lipidmatrix	Atto647-Marker	D_{MSD} [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	D_{CD} [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	D_{JD} [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
POPC	Lipid II	5,3	4,9	4,9
POPC	POPE	5,5	5,1	5,2
POPC + 0,2 mol% Lipid II	Lipid II	5,5	5,3	5,3
POPC + 0,2 mol% Lipid II	POPE	5,9	5,7	5,8
Standardfehler		$\leq 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$	$\leq 0,001 \mu\text{m}^2/\text{s}$	$\leq 0,05 \mu\text{m}^2/\text{s}$

Tabelle 2.2: Mobilität von POPE-Atto647 und Lipid-Atto647 in POPC-GUVs und POPC-GUVs mit Zusatz von 0,2 mol% Lipid II. Siehe Abbildung für die entsprechenden Anpassungen der MSD-Kurven, kumulativen Verteilungen der Abstandsquadrate und Sprungweitenverteilungen. Der Fehler für D_{MSD} , D_{CD} und D_{JD} unterschieden sich deutlich. Der Grund dafür ist, dass die Anzahl der Datenpunkte, die der jeweiligen Anpassung zugrunde lag, in die Berechnung des Standardfehlers mit eingeht. Typische Werte waren für MSD-Plots 10 Datenpunkte, für kumulative Verteilungen von r^2 10.000-20.000 Datenpunkte und für Sprungweitenverteilungen 40-50 Datenpunkte.

Die berechneten Viskositäten, unter Vernachlässigung einer möglichen Änderung der Membrandicke durch den Zusatz von 0,2 mol% nativem Lipid II, zeigten einen Unterschied zwischen Lipid II-haltigen gegenüber reinen POPC-Membranen. So war die Viskosität bei einer Anreicherung der POPC-Membran mit Lipid II um 12 % erniedrigt. Eine Mobilitätssteigerung bei Zusatz von 0,2 mol% nativem Lipid II zu der POPC-Membran wurde auch für Lipid II-Atto647 beobachtet. Dies deutet auf einen generellen Einfluss der Lipid II-Konzentration auf die Membranstruktur hin. Möglicherweise reduzieren die flexiblen Seitenketten die Ordnung der Phospholipide in der Membran, was die Viskosität der Membran erniedrigt [156]. Weiterhin wurde deutlich, dass die Diffusionskoeffizienten für Lipid II-Atto647 sowohl in reinen als auch in Lipid II-haltigen POPC-Membranen gegenüber denen von POPE-Atto647 leicht erniedrigt waren. Dies kann auf einen größeren effektiven Radius der Lipid II-Moleküle zurückgeführt werden. Dieser konnte mit den oben aufgeführten Literaturwerten und der ermittelten Membranviskosität berechnet werden. Die Berechnung ergab $R_{LII} = 0,58 \text{ nm}$.

2.7.2 Berechnung der Aggregatgrößen

Aus dem globalen Fit der kumulativen Verteilungen der Abstandsquadrate waren die drei Diffusionskonstanten $D_1 = 5,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_2 = 2,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $D_3 = 0,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt

worden. Der Wert für D_1 ist dem Wert für einzelne Lipid II-Moleküle $D_{LII} = 5,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ sehr ähnlich. Denkbar wäre, dass die leichte Reduktion der Mobilität bei Zugabe von Nisin durch die Bildung von 1:1 Komplexen zwischen Nisin und Lipid II entsteht. Um die repräsentativen Diffusionskoeffizienten aber bestimmten Diffusionsspezies zuzuordnen, wurde wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben angenommen, dass der Wert für D_1 einzelnen Lipid II-Atto647-Molekülen entspricht. Mit dieser vereinfachten Annahme konnte für einzelne Lipid II-Moleküle ein Radius von $R_{LII} = R_1 \approx 0,6 \text{ nm}$ berechnet werden. Mit der Näherung von Petrov und Schwille [67], die eine analytische Lösung im Sinne des Hughes-Pailthorpe-White-Modell bietet und im Gegensatz zum Saffman-Delbrück-Modell unabhängig von der Größe der Moleküle gültig ist, wurden korrespondierende Aggregatradien zu den D_2 - und D_3 -Werten bestimmt. Es ergaben sich $R_2 = 19 \text{ nm}$ und $R_3 = 1,1 \mu\text{m}$.

2.7.3 Abschätzung der Lipid II-Molekülzahl pro Aggregat

Die aus den Diffusionskoeffizienten der globalen Anpassung berechneten Radien der Aggregate waren für Membranpartikel sehr groß. Typische Membranproteine besitzen nur einen Radius von 2-4 nm [64]. Das bedeutet, dass in den gebildeten Aggregaten offensichtlich eine sehr hohe Anzahl an Lipid II-Molekülen enthalten war. Um die Anzahl der enthaltenen Lipid II-Moleküle abzuschätzen, wurde vereinfacht angenommen, dass sowohl einzelne Lipid II-Moleküle als auch Lipid II-Aggregate kreisförmige Flächen in der Membran einnehmen. Die Anzahl an Lipid II-Molekülen in den Aggregaten wurde daraufhin abgeschätzt, indem die maximale Zahl an Kreisflächen mit dem Radius $R = 0,6 \text{ nm}$ (einzelne Lipid II-Atto647 Moleküle) ermittelt wurde, die in die größeren Kreisflächen mit den Radien R_2 und R_3 (kleine und große Aggregate) passen. Diese Fragestellung ist äquivalent mit einem zweidimensionalen Packungsproblem der Mathematik, der Kreispackung in einem Kreis (Abbildung 2.24).

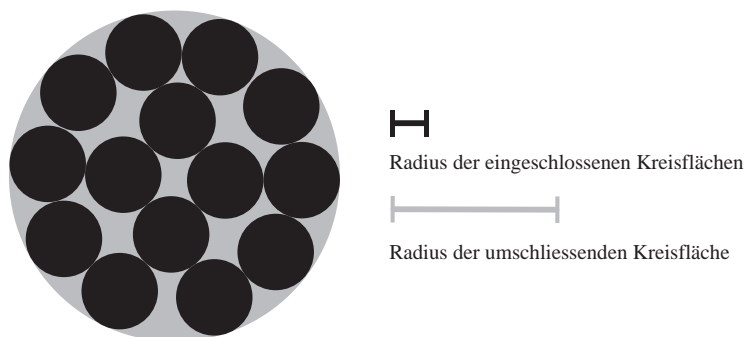


Abbildung 2.24: Schematische Darstellung des mathematischen Packungsproblems der Kreispackung in einem Kreis. Das Beispiel zeigt die dichteste Packung von $N = 14$ kleinen Kreisen. Bei einer dichtesten Packung dieser Kreise in einem großen Kreis bilden die Radien der äußeren und einer inneren Kreisfläche das Verhältnis 4,33.

Eine aktuelle Übersicht der Näherungslösungen findet sich auf einer Internetseite der Universität Magdeburg [157]. Kennt man, wie im Fall der Lipid II-Aggregate und Lipid II-Moleküle, die Radien der äußeren und einer eingeschlossenen Kreisfläche, kann man das Verhältnis der Radien berechnen. Somit konnte aus der genannten Übersicht die Maximalzahl der eingeschlossenen Kreisflächen bzw. Lipid II-Moleküle erhalten werden. Die Abschätzung ergab eine Anzahl von 850 Lipid II-Molekülen für Aggregate mit dem Radius R_2 . Einem Radius $R_3 = 1,1 \mu\text{m}$, wurden 1,75 Millionen Lipid II-Moleküle zugeordnet. In dieser Berechnung wird ein mit Sicherheit vorhandener Flächenbeitrag von Nisin und ein möglicher Beitrag der Phospholipide nicht berücksichtigt. Dies führt zu einer Überschätzung der Zahl an Lipid II-Molekülen in den Aggregaten. Damit sind die berechneten Mengen an Lipid II-Molekülen stark vereinfachte und ungenaue Abschätzungen. Trotzdem zeigen sie, dass eine sehr hohe Anzahl an Molekülen benötigt wird, um die Aggregate zu bilden, die entsprechend niedrige Mobilität aufweisen.

2.8 Membrankrümmungseffekte durch die Aggregatbildung

Es ist bekannt, dass die Aggregation von membrangebundenen Molekülen zu Änderungen der Membrankrümmung führen kann. Dies wiederum kann einen Membrankollaps oder eine Vesikelabschnürung auslösen [158, 159]. Da die Berechnung der Aggregatgrößen für die großen Aggregate einen Durchmesser von $\approx 1 \mu\text{m}$ ergab und damit im Größenbereich von Lipiddomänen lag, schien ein solcher Effekt auch für die nisininduzierte Lipid II-Aggregation möglich.

Um die Membran von POPC-GUVs, die 0,2 mol% Lipid II enthielten, zu visualisieren, wurde diese mit POPE-AF546 markiert. Zu diesen Vesikeln wurden 0,2 μM Nisin-AF647 (Nisin-zu-Lipid II-Verhältnis 4:1, Abbildung 2.25 A) und 1,5 μM Nisin-AF647 (Nisin-zu-Lipid II-Verhältnis 30:1, Abbildung 2.25 B) gegeben. Durch Zwei-Kanal-Abbildung (Abschnitt 5.8.3) wurden gleichzeitig die Membran und die Bindung des fluoreszenzmarkierten Nisins abgebildet. Somit konnte eine Auswirkung der Aggregatbildung auf die Membranorganisation untersucht werden.

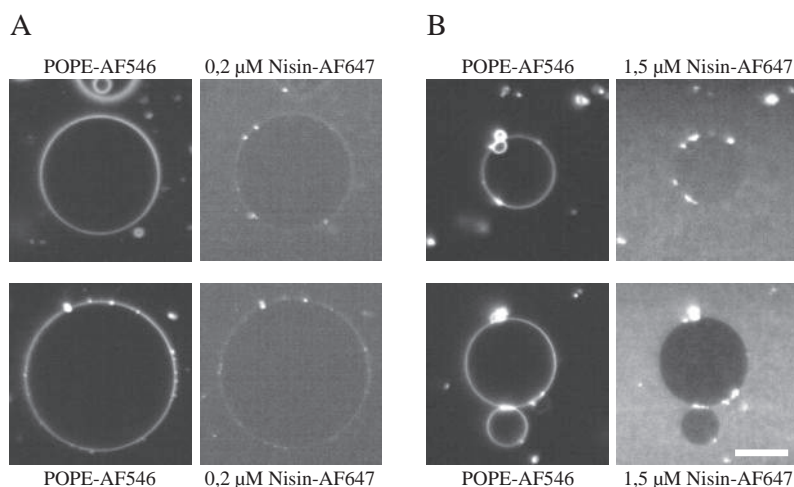


Abbildung 2.25: Vesikelknospung an GUVs aufgrund von nisininduzierter Lipid II-Aggregation. Exemplarische Bilder zeigen mit dem Phospholipid POPE-AF546 markierte Lipid II-haltige Membranen, an die Nisin-AF647 gebunden war. Nisin-AF647 wurde mit einer Konzentration von 0,2 μM (A) und 1,5 (B) μM zugegeben. Die höhere Nisinkonzentration bewirkte starke Membrandeformationen in Form von Vesikelabschnürungen. Maßstabsbalken 20 μm .

Bei Zugabe der niedrigeren Nisinkonzentration bildeten sich Nisinaggregate, die teilweise auch die Akkumulation von Phospholipiden an diesen Stellen verursachten. Dagegen erzeugte die Erhöhung des Nisin-zu-Lipid II-Konzentrationsverhältnisses deutlich größere Aggregate, wie an einer höheren Fluoreszenzintensität und größeren Ausdehnung zu erkennen war. Dies bestätigt auch die aus den Mobilitätsmessungen erhaltenen Größenunterschiede der Aggregate, die durch Variation des Nisin-zu-Lipid II-Konzentrationsverhältnisses auf-

traten. Die Bildung der großen Aggregate bewirkte immer auch eine Akkumulation von Phospholipiden und eine deutlich sichtbare Abschnürung von kleinen Vesikeln.

Die starke Aggregation von Nisin und Lipid II induzierte also eine Krümmung der GUV-Membran, was zu einer Deformation der kugelförmigen GUVs führte. Es bildeten sich sowohl nach außen als auch nach innen gestülpte, kleine Vesikel. Häufiger wurden dabei GUVs beobachtet, die nach außen gestülpte Vesikel besaßen. Diese schienen noch mit der Membran verbunden zu sein, denn sie bewegten sich auf der GUV Oberfläche. Ein Ablösungsereignis konnte nicht beobachtet werden.

Es wurde vermutet, dass Deformationsprozesse wie Vesikelabschnürungen die Membranstabilität beeinflussen. Deshalb wurde die Zahl der Vesikel N_{GUVs} bestimmt, die nach Zugabe der GUVs zu einer Nisinlösung einen Radius $R > 10 \mu\text{m}$ besaßen. Die Messung des Vesikelradius ist ein gutes Maß, um die Deformation und Destabilisierung der Membran zu analysieren. Eine Radiusreduktion wurde zum einen durch eine Formumwandlung aufgrund von Vesikelabschnürungen verursacht (Abbildung 2.26 A). Durch die lokale Bildung der kleinen Vesikel aus der Membranoberfläche der vorher kugelförmigen GUVs wurde der Radius der Riesenvesikel verkleinert. Zum anderen wurde eine Radiusreduktion beobachtet, wenn die Membran der GUVs teilweise so destabilisiert wurde, dass ein plötzlicher, vollständiger Kollaps auftrat (Abbildung 2.26 B). Dabei entstanden viele kleine Vesikel und unstrukturierte Membranaggregate.

Die Population der Vesikel mit $R > 10 \mu\text{m}$ zum Zeitpunkt der Vermischung der GUVs mit der Nisinlösung war nicht bekannt. Der erste Messzeitpunkt konnte erst nach 7,5 Minuten Inkubation gewählt werden, da die GUVs erst nach ca. 5 Minuten stabil am Probenkammerboden verblieben und erst dann die Aufnahmeparameter eingestellt werden konnte. In 5-minütigen Zeitintervallen wurden dann die GUVs mit $R > 10 \mu\text{m}$ während eines Beobachtungszeitraums von 20 Minuten gezählt.

Bei einer Konzentration von $0,2 \mu\text{M}$ Nisin wurde keine Veränderung von N_{GUVs} mit $R > 10 \mu\text{m}$ beobachtet, während die erhöhte Konzentration von $1,5 \mu\text{M}$ Nisin dagegen eine starke Abnahme von N_{GUVs} bewirkte (Abbildung 2.26 C). So sank während der Inkubationszeit von 25 Minuten der Radius bei 20 von 50 beobachteten GUVs unter einen Wert von $10 \mu\text{m}$. Dabei kollabierten 9 der 50 beobachteten GUVs. Wie bei der Abschnürung von kleinen Vesikeln gezeigt, korrelierte auch der Kollaps der GUVs mit der Größe der Nisinaggregate. Die Abnahme von N_{GUVs} ließ sich mit einer Exponentialfunktion beschreiben. Allerdings ist damit nicht berücksichtigt, dass zunächst vermutlich eine Aktivierungsphase nötig ist, in der die GUV-Population zunächst stabil bliebe und erst ab einer gewissen Inkubationszeit exponentiell abfallen würde. Deformations- und Destabilisierungseffekte entstünden nämlich vermutlich erst dann, wenn sich genug Nisin an der Membran sammeln und aggregieren könnte. Die Dauer einer solchen Aktivierungsphase ließ sich in diesem Experiment nicht feststellen.

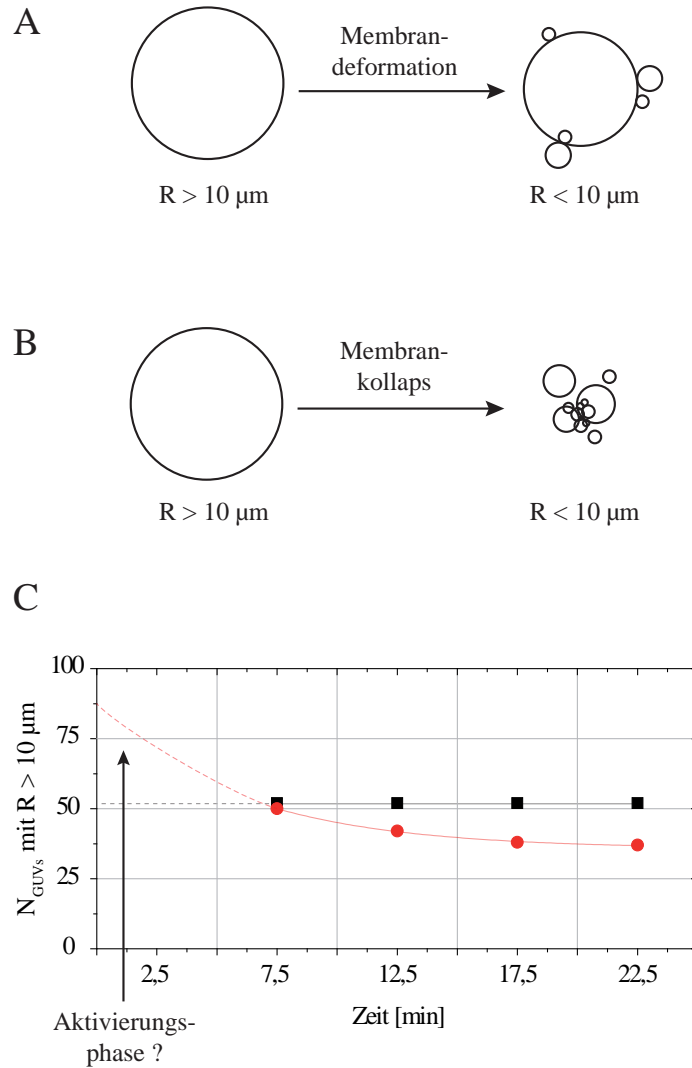


Abbildung 2.26: (A) Schematische Darstellung der Formumwandlung der GUVs, bei der sich kleine Vesikel auf ihrer Oberfläche bildeten und sich dadurch ihr Radius reduzierte. (B) Schematische Darstellung des GUV-Kollaps. (C) Abnahme der GUV-Anzahl N_{GUVs} mit einem Radius $R > 10 \mu\text{m}$ bei Zusatz von $0,2 \mu\text{M}$ (schwarz) und $1,5 \mu\text{M}$ Nisin (rot) während einer Inkubationszeit von 25 Minuten. In die Auswertung gingen für die Messung mit $0,2 \mu\text{M}$ Nisin 52 und für die Messung mit $1,5 \mu\text{M}$ Nisin 50 GUVs ein.

Der Kollaps der Membran war ein sehr schnelles, plötzlich auftretendes Ereignis. Somit war es nicht möglich, den exakten Moment des Membrankollaps abzubilden. Allerdings zeigt Abbildung 2.27 exemplarisch eine Zeitserie, bei der es gelang, die Zwischenstufe eines solchen Ereignisses einzufangen. Daran wird deutlich, wie man sich ein solches Ereignis möglicherweise vorstellen kann. So war zunächst ein intaktes GUV zu beobachten, dessen Membran impermeabel für den in der umgebenden Lösung enthaltenen Farbstoff LuciferYellow (LY) war. Allerdings war an der Stelle starker Nisinaggregation schon eine Vesikelabschnürung zu erkennen. Nach einer Minute war der Radius des GUVs deutlich reduziert, entweder durch eine Formumwandlung oder eine vollständige Abschnürung der kleinen Vesikel. Gleichzeitig wurde die Membran permeabilisiert und der Farbstoff konnte ins Innere des GUVs gelangen. Nach einer weiteren Minute war die Membran des beobachteten GUVs vollständig kollabiert und es war nur noch eine Ansammlung kleiner Vesikel zu beobachten.

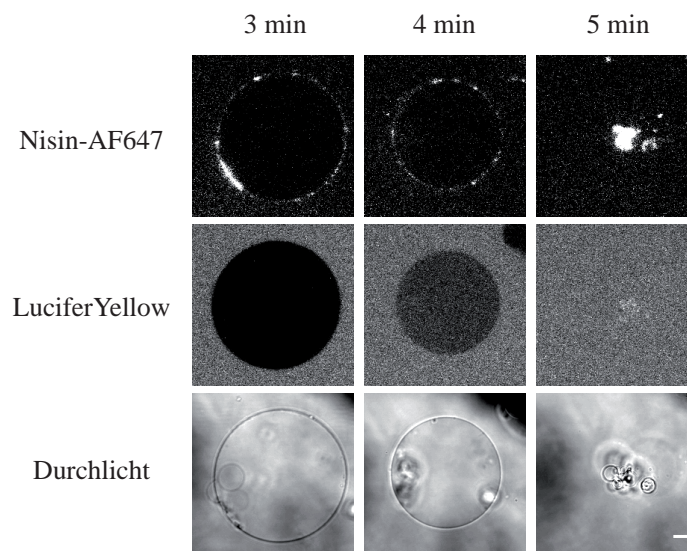


Abbildung 2.27: Kollaps eines GUVs. In der umgebenden Lösung waren $0,2 \mu\text{M}$ Nisin-AF647 und $30 \mu\text{M}$ LuciferYellow (LY) enthalten. Die obere Reihe zeigt die Fluoreszenz von Nisin-AF647, die mittlere Reihe die Fluoreszenz von LY und die untere Reihe den Durchlichtkanal zur Visualisierung der GUV Membran. Maßstabsbalken $10 \mu\text{m}$.

2.9 Membranpermeation durch Nisin

Um die Fähigkeit von Molekülen zur Membranpermeation zu quantifizieren, können Translokationsexperimente durchgeführt werden. Als Indikatoren werden dazu meist fluoreszente Moleküle verwendet. Diese können eine intakte Membran nicht passieren, da sie entweder zu polar oder zu groß sind. Der Indikator wird in die Vesikel eingeschlossen oder zu der umgebenden Lösung gegeben. Das Ein- oder Ausströmen des Indikators kann dann bei Verwendung von Riesenvesikeln mittels konfokaler Mikroskopie einfach visualisiert werden. Mit dieser Methode kann z. B. die Porenbildung von antimikrobiellen Peptiden nachgewiesen werden [38]. Durch die Messung der Membranpermeationseigenschaften von Nisin sollte der Zusammenhang zwischen Permeations- und Aggregationsverhalten analysiert werden.

2.9.1 Einfluss der Nisinbindungspartner

Die Membranpermeation durch Nisin wurde mittels der zeitabhängigen Translokation des Indikatorfarbstoffes LuciferYellow (LY) untersucht. LY ist ein kleiner, hydrophiler Farbstoff mit einem Stokesdurchmesser von 0,8 nm [160], der kleiner ist als der angenommene Durchmesser der Poren, die von Nisin und Lipid II gebildet werden [146].

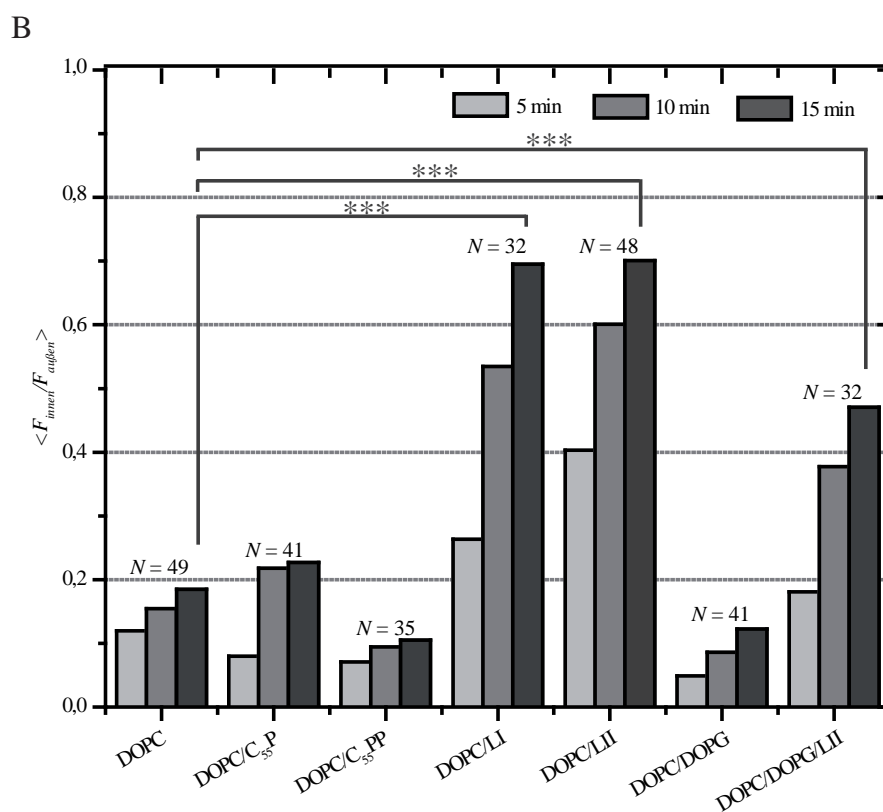
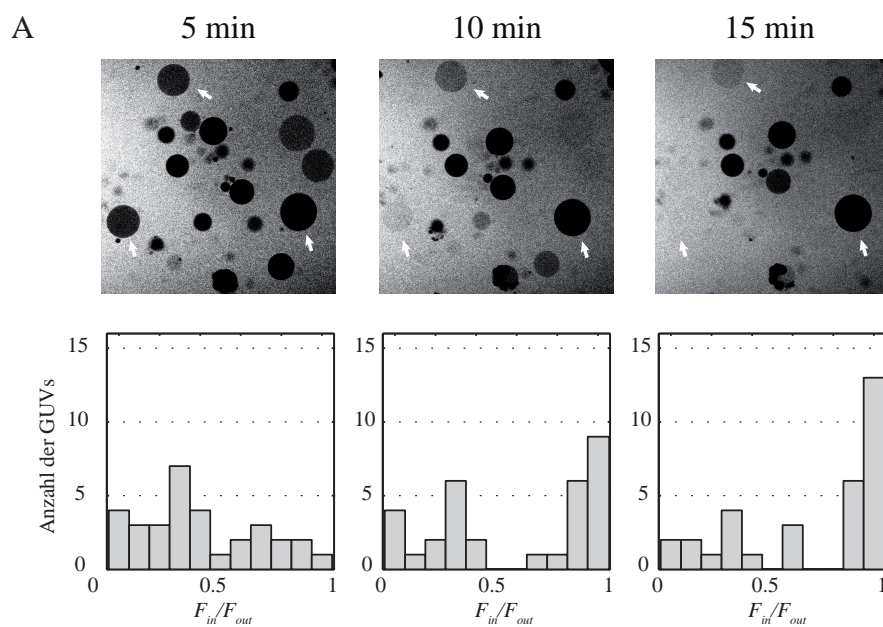
Die DOPC-GUVs, die die Baktoprenolmoleküle C₅₅-P, C₅₅-PP, Lipid I und Lipid II enthielten, wurden mit 0,2 µM Nisin-AF647 inkubiert und die Translokation von LY über einen Zeitraum von 15 Minuten beobachtet. Als Vergleich dienten neutrale DOPC-GUVs und negativ geladene GUVs, die 20 mol% DOPG enthielten. Als Maß für die Translokation wurde das Verhältnis der Intensität von LY innerhalb der GUVs, F_{innen} , und der Intensität außerhalb der GUVs, $F_{außen}$, verwendet. Bei einer vollständigen Äquilibrierung der Indikatorkonzentration nimmt das Verhältnis von $F_{innen}/F_{außen}$ einen Wert von 1 an. Das Verhältnis $F_{innen}/F_{außen}$ wurde für mindestens 30 GUVs je untersuchter Membranzusammensetzung als Funktion der Zeit bestimmt. Es fiel auf, dass einzelne GUVs zeitlich sehr unterschiedlich auf die Zugabe von Nisin-AF647 reagierten. Dies ist in Abbildung 2.28 A am Beispiel der Lipid II-haltigen GUVs gezeigt. Die obere Reihe zeigt beispielhaft für eine Messung die Fluoreszenz von LY nach 5, 10 und 15 Minuten Inkubation mit Nisin-AF647. Mit Pfeilen sind drei GUVs markiert, die entweder schlagartig, kontinuierlich oder kaum von Nisin permeabilisiert wurden. In der Reihe darunter sind die Histogramme des Verhältnisses $F_{innen}/F_{außen}$, das für insgesamt 48 GUVs bestimmt wurde, für die jeweiligen Zeitpunkte dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass die Verteilung sehr breit ist, sich aber mit zunehmender Inkubationszeit in Richtung eines Wertes von 1 verschiebt. Um die Ergebnisse in kompakterer Form zu präsentieren, wurden die Mittelwerte der Histogramme für $F_{innen}/F_{außen}$ für alle untersuchten Membranzusammensetzungen gebildet. Diese Werte sind in Abbildung 2.28 B dargestellt.

In Anwesenheit von Nisin war für jede Membranzusammensetzung ein Anstieg der Membranpermeabilität mit zunehmender Inkubationsdauer festzustellen. Der Effekt für reine Phospholipidvesikel war relativ gering und unterschied sich nicht für neutrale und negativ geladene Membranen. Elektrostatische Wechselwirkungen haben also im Bereich der verwendeten Konzentration von 0,2 μM Nisin, die im Bereich der MHK liegt, keinen Einfluss auf die Integrität der Membran. Ganz anders war der Effekt von Nisin, wenn spezifische Bindungspartner in der GU-Membran enthalten waren.

Wie durch Studien an großen unilamellaren Vesikeln erwartet [133], verursachte Nisin an Lipid II-haltigen GUVs eine starke Membranpermeation. Waren jedoch zusätzlich zu Lipid II 20 mol% negativ geladene Lipide in der Membran enthalten, war die Effizienz der Membranpermeation deutlich reduziert. An diesen Membranen konkurrierten zwei verschiedene Wechselwirkungen, nämlich elektrostatische und spezifische, von denen nur die spezifische Interaktion von Nisin mit den entsprechenden Membranlipiden im nanomolaren Konzentrationsbereich zu einer Zerstörung der Membranintegrität führt. Lipid I-haltige DOPC-GUVs wurden genauso wirksam permeabilisiert wie Lipid II-haltige DOPC-GUVs. Das ist aufgrund der chemischen Ähnlichkeit der beiden Moleküle wenig überraschend. Nicht nur besitzen Lipid I und Lipid II beide eine Pyrophosphatbindestelle, diese weist auch mit der Isoprenkette auf der einen Seite und der *N*-Acetylmuraminsäure auf der anderen Seite jeweils dieselbe chemische Umgebung auf.

C₅₅-P-haltige GUVs zeigten keine höhere Permeation durch Nisin im Vergleich zu reinen Phospholipidvesikeln. Das ist nicht überraschend, da eine Phosphatgruppe allein nicht als spezifisches Bindungsmotiv für Nisin ausreicht. Dagegen weist C₅₅-PP mit seiner Pyrophosphatgruppe eine solche Bindungsstelle auf [148]. Aber auch hier wurde keine veränderte Permeation gegenüber Phospholipidmembranen festgestellt. Dies ist übereinstimmend mit Ergebnissen aus Studien an großen unilamellaren Vesikeln, bei denen ebenfalls keine Membrandurchlässigkeit von C₅₅-PP-haltigen Liposomen beobachtet wurde [139]. Offensichtlich

Abbildung 2.28 (gegenüberliegende Seite): Membranaktivität von Nisin. In allen Experimenten wurde als Matrixlipid DOPC verwendet, dem jeweils 0,2 mol% der Baktopenolkomponenten und 20 mol% des negativ geladenen Phospholipids DOPG beigesetzt wurden. GUVs wurden in einer 250 mM Glucoselösung inkubiert, die 0,2 μM Nisin-AF647 und 30 μM LY enthielt. (A) zeigt eine Bildserie für Lipid II-haltige DOPC-GUVs. Die obere Reihe zeigt die Intensitätsverteilung von LY in der Vesikellösung zu den Zeitpunkten 5, 10 und 15 Minuten nach Zugabe von Nisin. Weiße Pfeile markieren drei Vesikel, die unterschiedliche Permeationskinetiken aufweisen. Die untere Reihe zeigt die Verteilung des Intensitätsverhältnisses $F_{\text{innen}}/F_{\text{außen}}$ für die jeweiligen Zeitpunkte. Für die Histogramme wurden die Verhältnisse für insgesamt 48 GUVs bestimmt. (B) zeigt die mittleren Verhältnisse für verschiedene Membranzusammensetzungen zu den entsprechenden Zeitpunkten. Die Permeation nahm mit der Zeit zu. Der unabhängige, beidseitige *t*-Test, angewandt für die Verhältnisse nach 15-minütiger Inkubation, ergab *p*-Werte < 0,001 für Lipid I- und Lipid II-haltige Vesikel im Vergleich zu reinen DOPC Vesikeln (Markierung mit ***). Die Permeation war nicht signifikant für die anderen Zusammensetzungen.



reichte die spezifische Bindung an C₅₅-PP für eine effiziente Membranpermeation nicht aus und es war dafür neben dem Pyrophosphat mindestens ein weiteres Strukturmotiv notwendig.

2.9.2 Einfluss des Nisin-Lipid II-Konzentrationsverhältnisses

Um den Einfluss des Nisin-zu-Lipid II-Konzentrationsverhältnisses auf die Permeationseffizienz von Nisin zu demonstrieren, wurden 0,2 mol% Lipid II-haltige POPC-GUVs mit zwei verschiedenen Konzentrationen an Nisin, nämlich 0,2 μ M und 1,5 μ M, inkubiert. Die Translokation des Farbstoffes LY wurde wie vorher beschrieben zeitlich verfolgt und der Mittelwert des Intensitätsverhältnisses $F_{innen}/F_{außen}$ als Säulendiagramm (Abbildung 2.29) dargestellt.

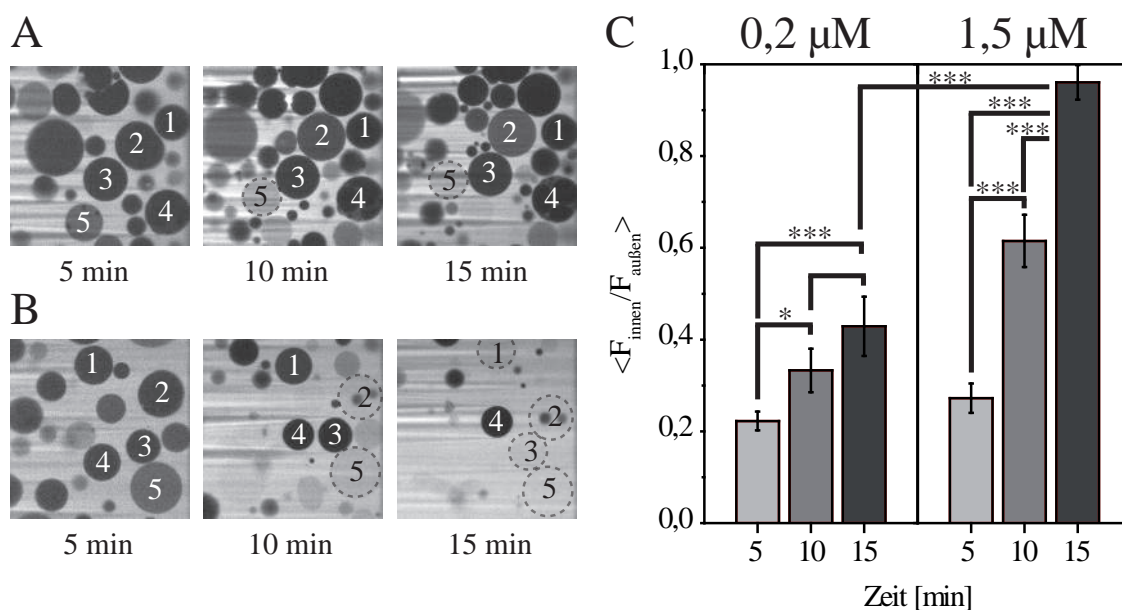


Abbildung 2.29: Membranpermeationsaktivität von Nisin in Abhängigkeit seiner Konzentration. GUVs, bestehend aus POPC mit 0,2 mol% Lipid II, wurden jeweils mit 0,2 (A) und 1,5 (B) μ M Nisin inkubiert. Die Fluoreszenz des zugegebenen LY wurde während 15-minütiger Inkubation detektiert und für 29 (A) und 28 (B) GUVs das Intensitätsverhältnis $F_{innen}/F_{außen}$ ausgewertet. Der Mittelwert dieses Verhältnisses ist in (C) nach 5, 10 und 15 Minuten Inkubation gezeigt. Signifikanz wurde wie in Abschnitt 5.9.1 beschrieben getestet und gekennzeichnet.

Die Abbildung zeigt, dass die Membran effizienter permeabilisiert wurde, wenn das Nisin-zu-Lipid II-Verhältnis von 4:1 auf 30:1 erhöht wurde. Dieser Unterschied machte sich während der ersten 5 Minuten der Inkubationszeit kaum bemerkbar, während er nach 10 Minuten Inkubation deutlich erkennbar war. Nach 15 Minuten war bei einem Verhältnis von 4:1 ein Wert von 0,45 und bei einem Verhältnis ein Wert von 30:1 von 0,95 für $\langle F_{innen}/F_{außen} \rangle$ erreicht.

Um den Porenbildungsmechanismus weiter zu charakterisieren, lohnt es sich, nicht nur den Mittelwert von $F_{innen}/F_{außen}$, sondern auch einzelne GUVs zu betrachten. Ein Wert von 0,45 wie bei einem Konzentrationsverhältnis von 4:1 kann auf zwei Arten zustande kommen: entweder wurde nur die Hälfte der GUVs permeabilisiert, das aber vollständig, oder alle Vesikel wurden teilweise permeabilisiert. Ersteres würde auf die stochastische Bildung sehr stabiler Poren hindeuten, während Letzteres eher Hinweise auf die gleichmäßige Bildung transienter Poren liefern würde. Die in Abbildung 2.29 A dargestellten GUVs zeigen, dass manche Vesikel mit der Zeit vollständig gefüllt waren, während andere nach 15 Minuten wenig oder gar nicht permeabilisiert wurden. Das deutet darauf hin, dass es sich eher um ein Permeationsverhalten wie im ersten Fall handelt. Bei dem hohen Nisin-zu-Lipid II Verhältnis von 30:1 Abbildung 2.29 B war die Permeation deutlich schneller als bei einem Verhältnis von 4:1, so dass nach 15 Minuten Inkubation alle anderen GUVs eine vollständige Translokation von LY zeigten.

3 Diskussion

3.1 Aggregation in bakteriellen Membranen

Schon 2006 wurde die Bildung von großen Nisinaggregaten von Hasper und Mitarbeitern in der bakteriellen Membran gezeigt [137]. Dies führte dazu, neben der bereits bekannten Porenbildung [133, 144] einen alternativen Tötungsmechanismus durch die Umverteilung der Lipid II-Moleküle in den Bakterienzellen und eine damit verbundene Inhibierung der Zellwandbiosynthese zu vermuten. Allerdings wurden in den Experimenten fixierte Zellen verwendet. Damit ließ sich der Einfluss der Aggregatbildung auf die antimikrobielle Aktivität von Nisin nicht eindeutig nachweisen. Lamsa und Mitarbeiter verwendeten zwar 2012 lebende Zellen und den Indikator SYTOX Green zur Feststellung der Zellviabilität, allerdings kein fluoreszenzmarkiertes Nisin, um die Aggregatbildung direkt zu zeigen. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Relevanz der Aggregatbildung für den Tötungsmechanismus nachgewiesen. So war erst ab einem Grenzwert der Nisin-AF647-Intensität ein Eindringen des SYTOX Green-Farbstoffes zu beobachten. Das bedeutet, dass für eine effektive Membranpermeation eine bestimmte Aggregatgröße notwendig zu sein scheint und nur größere Aggregate die Zellen stark schädigten. Somit ist es wahrscheinlich, dass große Aggregate eine höhere Toxizität besitzen als kleine Oligomere. Eine klare Korrelation zwischen der Aggregatgröße und dem Grad der Membranschädigung war nicht zu erkennen, was dafür spricht, dass die Permeation ein stochastischer Prozess ist.

Die Anzahl der Lipid II-Moleküle in Gram-positiven Bakterien wird auf etwa 35.000 bis 200.000 Moleküle pro Zelle geschätzt [104]. Sie sind in der Bakterienmembran nicht wie im Modellsystem gleichmäßig verteilt. In der exponentiellen Wachstumsphase ist Lipid II am Septum und in Regionen der Zellelongation von *Bacillus subtilis* lokalisiert, wo es von ineinandergreifenden Proteinkomplexen der Zellwandbiosynthesemaschinerie gebildet wird [161]. In Übereinstimmung damit wurde die Bildung von großen Nisinaggregaten vor allem in der Mitte und an den Polen der Zelle, also in Regionen der aktiven Lipid II-Synthese, beobachtet. Vermutlich wird durch die lokale Anreicherung des frisch synthetisierten Lipid II die Aggregation von Nisin erleichtert. Wie in dieser Arbeit gezeigt, wirkt sich eine starke Aggregation auf die Organisation der Lipiddoppelschicht aus und führt zur Porenbildung, die mit der Aggregatgröße korreliert. Daher kann angenommen werden, dass die Porenbildung auch in Bakterien mit fortschreitender Aggregation zunimmt und eine Ursache für den Zelltod ist. Zusätzlich kann die Aggregation zu einer Fehllokalisation der Zellwandbiosynthesemaschinerie führen. Das würde Beobachtungen von abnormalen, morphologischen

Veränderungen in der Nähe der Zellteilungsstelle in *Bacillus subtilis* nach Behandlung mit Nisin erklären [138]. Außerdem könnten weitere für die Zellteilung relevante, membranasoziierte Prozesse von einer Fehllokalisation von Lipid II betroffen sein.

3.2 Interaktion von Nisin mit Modellmembranen

Die Interaktion von fluoreszenzmarkiertem Nisin mit Modellmembranen unterschiedlicher Zusammensetzung zeigten deutlich den Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer Wechselwirkung. Dies ließ sich sehr deutlich anhand der Verteilung des Fluoreszenzsignals des markierten Nisins an der Vesikelmembran erkennen. Aus Studien an LUVs war bekannt, dass die elektrostatische Anziehung zwischen dem positiv geladenen Nisin und einer negativ geladenen Membran eine stöchiometrische Bindung bewirkt. Dabei wird ein negativ geladenes Lipid je positiv geladener Aminogruppe gebunden [133]. Wie erwartet zeigte sich, dass Nisin nicht mit neutralen Lipiddoppelschichten interagiert, aber schnell an negativ geladene Phospholipidmembranen bindet. Die ladungsbedingten Wechselwirkungen führten zu einer homogenen Verteilung von Nisin an der Membran.

Für kationische, antimikrobielle Peptide wird allgemein angenommen, dass elektrostatische Wechselwirkungen auch die Bindung an die Bakterienmembran *in vivo* initiieren. Allerdings reduzierte die Anwesenheit von Ionen in der Lösung die Bindung von Nisin an negativ geladene GUVs deutlich, so dass attraktive, elektrostatische Wechselwirkungen allein nicht die starke Bindung an bakterielle Membranen erklären können. Wie schon 1998 von Brötz und Mitarbeitern gezeigt, bindet Nisin spezifisch an das bakterielle Lipid II [135]. Im Gegensatz zu der elektrostatisch bedingten führte die spezifische Bindung an Lipid II zu einer inhomogenen Verteilung von Nisin an der Membran. Zu beobachten war die Bildung von großen Aggregaten, wodurch auch eine Umverteilung der vorher homogen in der GUV-Membran verteilten Lipid II-Moleküle bewirkt wurde. Von Hasper und Mitarbeitern wurde schon 2006 gezeigt, dass bei Bindung von Nisin an Lipid II-haltige GUVs eine Aggregation stattfindet und eine solche Aggregation auch in der Bakterienmembran zu beobachten ist [137].

In negativ geladenen, Lipid II-haltigen Vesikeln wurde eine Konkurrenzsituation zwischen spezifischen und unspezifischen Wechselwirkungen erzeugt. Tatsächlich wurden sowohl elektrostatische Wechselwirkungen (homogene Membranverteilung) als auch spezifische Wechselwirkungen (Aggregate) beobachtet. Die spezifischen Wechselwirkungen waren allerdings stärker, da sie auch durch Zusatz von Ionen nicht reduziert wurden. Um den Effekt der spezifischen Bindung getrennt von unspezifischen Wechselwirkungen untersuchen zu können, wurde für alle weiteren quantitativen Messungen in dieser Arbeit eine Membranmatrix aus neutralen DOPC Lipiden verwendet.

Durch NMR-Untersuchungen ist bekannt, dass Nisin und Lipid II einen 1:1-Komplex formen, indem die beiden N-terminalen Lanthioninringe von Nisin einen Käfig um die Pyrophosphatgruppe von Lipid II bilden [148]. In Einklang damit zeigten weitere NMR-Untersuchungen, dass Nisin auch mit C₅₅-PP Komplexe bildet [139]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein der Pyrophosphatgruppe auch relevant für die Ag-

gregation von Nisin ist, da mit C₅₅-PP ebenfalls Aggregate gebildet wurden. Allerdings wurde die Zahl der gebildeten Aggregate und vor allem ihre Größe stark von dem Nisinbindungspartner beeinflusst. Die Lipid II-Nisin-Aggregate waren deutlich größer als die von C₅₅-PP und Nisin gebildeten und traten mit größerer Häufigkeit in der Membran auf. Das Aggregationsverhalten von Nisin mit Lipid II war vergleichbar zu dem mit Lipid I. Mit C₅₅-P wurden dagegen keine signifikant größeren Aggregate als an reinen DOPC-Membranen gebildet. Damit lassen sich die für die Aggregation relevanten Struktur motive auf die Pyrophosphatgruppe und die N-Acetylmuraminsäure in der Lipid I und Lipid II Kopfgruppe reduzieren. Dass die N-Acetylmuraminsäure ein weiteres Bindemotiv für Nisin bietet, wurde auch schon von Bonev und Mitarbeitern [139] vermutet.

3.3 Analyse der Nisin-Lipid II-Aggregation in Modellmembranen

Der durch die Bindung von Nisin an Lipid II induzierte Aggregationsprozess an Modellmembranen wurde in dieser Arbeit anhand der Mobilität von fluoreszenzmarkiertem Lipid II quantitativ untersucht. Die Mobilität der Lipid II-Moleküle wurde mittels Lichtscheibenmikroskopie an Riesenvesikeln vor und nach Zugabe von Nisin gemessen. Die Einzelmolekülverfolgung mittels Lichtscheibenmikroskopie bietet viele Vorteile. Durch die Verwendung eines stabilen Farbstoffes, wie hier Atto647, die Reduzierung des Hintergrundes und die selektive Beleuchtung können sehr lange Einzelmolekültrajektorien mit hohem Signal-zu-Rausch-Verhältnis detektiert werden, sodass sogar eine dreidimensionale Verfolgung von Lipiden in GUVs möglich ist [151].

Durch die Korrelation zwischen Diffusionskoeffizient und Partikelgröße [62, 67] war es möglich, das Wachstum der Aggregate anhand der Änderung der Diffusionsgeschwindigkeit der Lipid II Partikel zu verfolgen. Erschwert wurden die Messungen dadurch, dass innerhalb eines kurzen Zeitfensters von nur 25 Minuten möglichst viele repräsentative GUVs ausgewählt werden mussten, um die Lipid II-Atto647-Diffusion zu messen. Dabei wurden häufiger Vesikel beobachtet, die scheinbar keine fluoreszenten Lipid II-Moleküle enthielten und nicht vermessen werden konnten. Andererseits wurden in anderen GUVs sehr helle und große Lipid II-Atto647-Partikel beobachtet. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Kinetik des Aggregationsprozesses für die einzelnen GUVs sehr unterschiedliche war. Deswegen war es nicht möglich, ein kinetisches Modell zu entwickeln. Durch Mittlung der aufgenommenen Daten für verschiedene GUVs ließen sich aber zeitliche Trends im Aggregationsprozess aufzeigen und Aggregatgrößen abschätzen.

Die aus den Messungen erhaltenen Einzelmolekültrajektorien wurden mit verschiedenen Analysemethoden ausgewertet. Diese Methoden beleuchteten alle verschiedene Aspekte des Aggregationsprozesses. So konnte der Aggregationsprozess mit den unterschiedlichen Interpretationen der Daten gut charakterisiert werden. Die zuerst durchgeführte MSD-Auswertung lieferte nur Mittelwerte der Diffusionskoeffizienten, an denen allerdings die mittlere, zeitliche Änderung der Diffusion gut erkennbar war. Die Analyse der MSDs der einzelnen Trajektorien erzielte dagegen eine Verteilung der Diffusionskoeffizienten. Das Aggregatwachstum war anhand der zunehmenden Verschiebung der Verteilungen hin zu kleineren Diffusionskoeffizienten erkennbar. Eine solche Verteilung gibt mit Sicherheit ein realistischeres Bild der Mobilitätspopulation wieder als die mittleren MSD-Werte. Allerdings lieferte die Auswertung kurzer Trajektorien ungenaue Werte für die Diffusionskoeffizienten, so dass ein Drittel der Daten für diese Auswertung nicht berücksichtigt werden konnte. Um die Größen der Aggregate abschätzen zu können, wurden noch die Verteilungen der Sprungweiten analysiert, die sich aufgrund eines statistischen Modells quantitativ beschreiben

lassen. Durch eine globale Anpassung der Verteilung wurden repräsentative Diffusionskoeffizienten erhalten. Dies führt zwar zu einer Parametrisierung der Daten, berücksichtigt aber eine bestimmte Anzahl an unterschiedlichen Diffusionsspezies. Die optimale Anzahl wurde anhand der Anpassungsgüte festgelegt.

So wurden drei Diffusionskoeffizienten ermittelt, mit denen die Daten ausreichend gut beschrieben wurden. Sie wurden verschiedenen Spezies zugeordnet: einzelne, ungebundene Lipid II-Moleküle und zwei Aggregatklassen unterschiedlicher Größe. Kleine Aggregate enthielten Hunderte Lipid II-Moleküle und möglicherweise auch Phospholipide. Bei einem hohen Überschuss von Nisin über Lipid II bildeten sich kleine Aggregate schneller und häufiger als bei einem geringeren Überschuss an Nisin. Zum anderen gab es große Aggregate, die erst bei einem Konzentrationsverhältnis von 30:1 nach 20-minütiger Inkubationszeit auftraten und Hunderttausende Lipid II-Moleküle und mit großer Wahrscheinlichkeit Phospholipide enthielten. Diese Aggregate besaßen die Ausdehnung von Lipiddomänen und führten zu einer Deformation der Membran. Für die Abschätzung der in den Aggregaten enthaltenen Lipid II-Zahl wurde eine grobe, geometrische Abschätzung verwendet. Zu bedenken ist, dass hier die Fläche, die von den Nisinmolekülen eingenommen wurde, nicht berücksichtigt werden konnte, da dafür keine zuverlässigen Strukturdaten vorlagen. Ebenso wurde ein möglicherweise vorhandener Flächenanteil der Phospholipide unterschlagen. Phospholipide könnten zwischen den Nisin-Lipid II-Komplexen auftretende Zwischenräume füllen. Trotzdem gibt diese Abschätzung die Größenordnung der beteiligten Molekülzahl (10^5 - 10^6) wieder.

Diese hohe Molekülzahl in einem Aggregat widerspricht der von Hasper und Mitarbeitern vermuteten Bildung von stabilen Oligomeren aus vier Lipid II und acht Nisinmolekülen, die einen Kanal in der Membran bilden. Dieses Porenmodell beruht auf dem im folgenden kurz beschriebenen Experiment [142]. Es wurde die Excimerbildung von pyrenmarkierten Lipid II-Molekülen in DOPC-LUVs unter Zugabe von Nisin beobachtet. Ein Excimer bildet sich zwischen einem Pyrenmonomer im Grundzustand und einem Pyrenmonomer im angeregten Zustand, wenn diese sich in einem Abstand von ≈ 2 nm in einer präzisen, planar gestapelten Anordnung befinden [162]. Bei der Bildung von Nisin-Lipid II-Oligomeren und -Aggregaten kommen sich Lipid II-Moleküle nahe genug, um Excimere zu bilden. Somit wurde die Excimerbildung von pyrenmarkierten Lipid II-Molekülen von Hasper und Mitarbeitern als Indikator für die Aggregatbildung verwendet werden.

Bei dem schrittweisen, teilweisen Ersatz von markiertem durch unmarkiertes Lipid II verringerte sich die Excimerintensität, da sich bei geringerem Anteil an pyrenmarkiertem Lipid II in den Aggregaten statistisch weniger Excimere bildeten. Durch lineare Extrapolation bestimmten Hasper und Mitarbeiter den Anteil an unmarkiertem Lipid II, bei dem gerade keine Excimerbildung mehr vorhanden war. Allerdings kann man bezweifeln, ob die durchgeführte Extrapolation korrekt ist, da sie nicht gut mit den gemessenen Werten über-

einstimmte. Weitere Fragen wirft die weitere Interpretation der Ergebnisse auf. Hasper und Mitarbeiter schlossen aus dem durch Extrapolation bestimmten Anteil an unmarkiertem Lipid II auf das Verhältnis von unmarkiertem zu markiertem Lipid II und erhielten einen Wert von 3:1, woraus sie eine Oligomergröße von 4 Lipid II-Molekülen ableiteten. Diese Überlegung scheint aber nur plausibel, wenn man von vorneherein annimmt, dass sich kleine Oligomere bilden werden und ist somit kein Beleg dafür. Die Abnahme der Excimerbildung ist ein statistisch bedingter Verdünnungseffekt und tritt unabhängig von der Aggregatgröße auf. Allein aufgrund des beschriebenen Experiments ist die Existenz von stabilen, kleinen Oligomeren also keineswegs gesichert, obwohl das daraus abgeleitete Modell einer Pore aus vier Lipid II und acht Nisinmolekülen immer noch Bestand hat. Die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen schließen eine solche Oligomerbildung nicht aus, zeigen aber, dass auch sehr große Nisin-Lipid II-Aggregate in der Größenordnung von 10^5 - 10^6 Lipid II-Molekülen gebildet werden. Es wurde von Hasper und Mitarbeitern selbst entdeckt, dass Nisin große Aggregate in Lipid II-haltigen GUVs und Bakterienmembranen bilden kann [137]. Wie in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden konnte, ist die Größe der Aggregate von biologischer Relevanz und wirkt sich ab einem Grenzwert toxisch für die Bakterienzellen aus.

Nimmt man an, dass sich ausgehend von 1:1-Komplexen zwischen Nisin und Lipid II tatsächlich Aggregate aus Hunderttausenden von Molekülen bilden können, stellt sich die Frage, welche physikochemische Triebkraft die Ursache dafür ist. Die Mobilitätsmessungen zeigten, dass zwischen den Lipid II-Molekülen selbst keine spezifischen intermolekularen Wechselwirkungen existieren. Die Situation von Lipid II in der POPC-Matrix war also vergleichbar mit einer idealen, zweidimensionalen Lösung mit POPC als Lösungsmittel und Lipid II als gelöster Substanz. Die Bindung von Nisin an Lipid II leitete die Aggregation ein. Statt einer idealen Lösung handelte es sich nun um eine reale Lösung, in der sich die Lipid II-Nisin-Komplexe nicht mehr in der POPC-Matrix lösten. Wenn in realen Lösungen die Interaktionsenergie des gelösten Stoffes groß genug ist, kann die Translationsentropie überwunden werden und eine Segregation des gelösten Stoffes stattfinden, die zur Aggregation des Stoffes führt. Die Translationsentropie kann aber auch wie beim hydrophoben Effekt durch indirekte Wechselwirkungen kompensiert werden.

Solche Wechselwirkungen können membranvermittelt sein. Es ist bekannt, dass sich bei der Bindung an Lipid II die Konformation von Nisin ändert [148], was ein tieferes Eindringen in die Membran ermöglicht [140, 156]. Durch das Eindringen von Nisin verändert sich das Membrandruckprofil durch die Erhöhung der Freien Energie. Die Freie Energie setzt sich dabei aus der Grenzflächenenergie, die durch den Kontakt der Lipidketten mit der wässrigen Umgebung entsteht, und der Energie, die durch die peptidinduzierte Störung der Lipidpackung entsteht, zusammen. Zemel und Mitarbeiter sagten mittels theoretischer Berechnungen voraus, dass bei zunehmender Dichte von membranadsorbierten Peptiden,

ausgelöst durch die Minimierung der Freien Energie, eine Phasentrennung in eine peptidreiche und eine peptidarme Phase erfolgt [114]. Weiterhin kann die Änderung der Membrankrümmung, die durch das Einringen von Peptiden verursacht wird, eine Triebkraft für die Peptidaggregation sein [81]. Die Autoren zeigten, dass nach Erreichen einer minimalen, lokalen Biegeenergie Modellproteine ohne weitere spezifische Interaktionen aggregieren. Inwieweit solche Effekte verantwortlich für die Aggregation von Nisin und Lipid II sind, lässt sich experimentell kaum feststellen. Allerdings würden Molekulardynamiksimulationen mit Sicherheit mehr Aufschluss über diesen Punkt geben.

3.4 Membrandeformation durch Nisin

Es wurde beobachtet, dass bei dem hohen Nisin-zu-Lipid II-Verhältnis von 30:1 nicht nur größere Aggregate entstanden als bei einem Verhältnis von 4:1, sondern dass die großen Aggregate auch Deformationen an der GUV-Membran bewirkten. Fluoreszenzaufnahmen zeigten, dass Abschnürungen kleiner Vesikel immer an Stellen entstanden, an denen sich auch große Nisin-Lipid II-Aggregate gebildet hatten. Es wurde außerdem an einigen GUVs ein vollständiger Membrankollaps beobachtet, aber ebenfalls nur bei hohem Nisinüberschuss. Dies ist bei antimikrobiellen Peptiden keine unbekannte Wirkung. Auch von anderen membran-lytischen Peptiden und Reagenzien ist bekannt, dass sie Vesikelabschnürungen bewirken und die Membran destabilisieren [76, 163]. Formumwandlungen von sphärischen Vesikeln wie „Vesikelknospung“ sind theoretisch gut beschrieben [164] und werden hauptsächlich durch eine Änderung der Flächendifferenz ΔA zwischen den beiden Schichten der Lipiddoppelschicht wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben bewirkt. Wie in Experimenten für die Peptide Peptide-1 und Magainin 2 gezeigt wurde [165, 166], führt ihre asymmetrische Adsorption tatsächlich zu einer Erhöhung von ΔA und zu Formumwandlungen. Ein ähnlicher Effekt kann auch für Nisin vermutet werden.

Bei der spezifischen Bindung an Lipid II ändert Nisin seine Orientierung im Vergleich zur elektrostatischen Bindung an negativ geladene Phospholipidmembranen [140]. Dies zeigten Untersuchungen an tryptophanmarkierten Nisinmutanten. Da das Fluoreszenzspektrum von Tryptophan durch die Hydrophobizität seiner Umgebung beeinflusst wird, konnten durch gezielte Markierung von Nisin am N-Terminus, der mittleren Region und dem C-Terminus die Positionen dieser Moleküldomänen in den hydrophoben und hydrophilen Bereichen der Membran lokalisiert werden. Es wurden Messungen an Lipid II-haltigen im Vergleich zu negativ geladenen Vesikeln durchgeführt. Die Messungen ergaben, dass der N-Terminus von Nisin durch Bindung an Lipid II aus der Membran gehoben wird. Die mittlere Region drang dagegen tiefer in den hydrophoben Bereich ein und für den C-Terminus wurde nur eine geringe Änderung und eine Positionierung in der Grenzschicht der Membran im Bereich der Lipidkopfgruppen festgestellt. Die Autoren schlugen aufgrund dieser Daten eine membranüberspannende Konformation von Lipid II-gebundenem Nisin vor. Da von anderen antimikrobiellen Peptiden wie z.B. Magainin bekannt war, dass sie ab einer bestimmten Membrankonzentration eine Umorientierung von einer parallelen zu einer senkrechten Membranorientierung durchlaufen und stabile transmembrane Poren bilden, scheint dies auch für Nisin möglich zu sein. Allerdings ist anhand der Tryptophanexperimente nicht eindeutig zu klären, auf welcher Seite der Membran sich die C-terminale Domäne von Nisin in Bezug auf die gebundene Lipid II-Kopfgruppe befand. Damit ist nicht auszuschließen, dass Nisin statt einer transmembranen Konformation bei Bindung von Lipid II auch eine U-förmige Konformation einnehmen kann.

In beiden Konformationen bewirkt das tiefe Eindringen des Peptids in die Membran jedoch eine Umstrukturierung der Membran. Generell verändert die asymmetrische Adsorption von Partikeln an eine Membran die Membrankrümmung. Gerade amphipatischen, α -helikalen Peptiden wurde häufig die Fähigkeit zugesprochen, eine Biegeverformung in Membranen hervorzurufen oder die Bildung stark gekrümmter Strukturen wie Poren zu fördern [167]. Zemel und Mitarbeiter sagten aufgrund von theoretischen Überlegungen voraus, dass das Vorzeichen der Krümmung von der Eindringtiefe der Peptide abhängt [168]. Dabei modellierten sie die Peptide als parallel zur Membran liegende Zylinder. Die Experimente dieser Arbeit zeigen, dass Nisin zwar häufiger eine positive Krümmung, aber auch eine negative Krümmung der Membran hervorrief. Es lässt sich nun spekulieren, ob unterschiedliche Konformationen, nämlich die transmembrane und die U-förmige, verantwortlich für das Vorzeichen der Krümmung sein könnten.

Die entstehende Krümmung hängt aber außerdem von der Größe der adsorbierten Partikel ab [169]. Deshalb wurde erwartet - auch beobachtet - dass sich vor allem mit zunehmendem Wachstum der Nisin-Lipid II-Aggregate die lokale, spontane Krümmung an der GUV-Membran ändert. Tsai und Mitarbeiter präsentierten 2008 ein theoretisches Modell der Partikeladsorption und -aggregation an einer Membranoberfläche [77]. Darin wurde prognostiziert, dass sich ab einer kritischen Aggregatgröße, d. h. ab einer bestimmten Anzahl an lokal akkumulierten Partikeln, in Folge der Minimierung der Biegeenergie Vesikelabschnürungen bilden würden. Tatsächlich verursachten nur große Aggregate, wie sie bei einem Nisin-zu-Lipid II-Verhältnis von 30:1 gebildet wurden, eine Deformation der Membran. Dies führte zu einer Formumwandlung und Entstehung von kleinen Vesikeln an der GUV-Oberfläche bis hin zu einem totalen Kollaps der GUVs. Dagegen wurde die Membran von kleinen Aggregaten, wie sie bei einem Nisin-zu-Lipid II-Verhältnis von 4:1 gebildet wurde, kaum deformiert.

3.5 Korrelation von Aggregation und Membranpermeation

Generell wird die Dynamik der Porenbildung in Membranen durch ein Zusammenspiel zwischen der Membranspannung, die zu einer Expansion der Poren führt, und der Linienspannung, die einer Schließung der Pore entgegenwirkt, bestimmt [170]. Die Fähigkeit von antimikrobiellen Peptiden, stabile Poren in Membranen zu bilden, besteht zum einen in ihrer Eigenschaft, durch Insertion in die Membran eine interne Membranspannung und damit eine Pore zu erzeugen. Bevor es zu einer Porenbildung kommt, ist aufgrund der erzeugten Membranspannung zunächst ein Ausdünnen der Membran zu beobachten [171]. Zum anderen haben die amphipatischen Peptide eine hohe Affinität zum Porenrand, verringern dadurch die Linienspannung und wirken der Porenbildung entgegen. Durch das entstehende Gleichgewicht der beiden Effekte entstehen stabile Poren, für die Huang und Mitarbeiter aufgrund des vorgeschlagenen Modells der Porenbildung einen Radius von 1-2 nm abschätzten [171]. Diese theoretischen Überlegungen stimmen sehr gut mit experimentell bestimmten Porengrößen, unter anderem mit dem Durchmesser für Nisin-Lipid II-Poren von 2-2,5 nm mit einer mittleren Lebensdauer von 6 s [146], überein. Die Lebensdauer und Größe der Nisin-Lipid II-Poren waren mittels Leitfähigkeitsmessungen an Modellmembranen bestimmt worden [146].

In dieser Arbeit wurde die Permeationsfähigkeit von Nisin untersucht, um eine Verbindung mit seiner Fähigkeit zur Aggregatbildung herzustellen. Dazu wurde die Permeation der GUVs durch Nisin unter den gleichen Bedingungen untersucht wie sein Aggregationsverhalten. Der Grad der Membranpermeation wurde anhand der Translokation eines inerten Farbstoffes beobachtet. Der Farbstoff besaß einen Durchmesser von ca. 1 nm und war damit kleiner als der Durchmesser der putativen, stabilen Nisinporen [146].

Schon 2004 wurde von Bonev und Mitarbeitern [139] beschrieben, dass zwar bei Bindung von Nisin an Lipid II-haltige LUVs Poren gebildet werden, nicht jedoch bei Bindung von Nisin an C₅₅-PP-haltige LUVs. Dies wurde in den Messungen dieser Arbeit an GUVs bestätigt. Das ist insofern erstaunlich, da die Pyrophosphatgruppe als Bindemotiv für Lipid II identifiziert worden war. In dieser Arbeit wurde die Membranpermeation von Nisin außerdem noch in Gegenwart von C₅₅-P und Lipid I bestimmt. Wie erwartet, wurde keine Membranpermeation beobachtet, wenn C₅₅-P in der Membran enthalten war. Die Korrelation von Membranpermeation und Aggregatgröße deutet an, dass die Aggregatgröße eine wesentliche Rolle für die Permeationsfähigkeit von Nisin spielt.

Wie auch schon von Bonev und Mitarbeitern [139] beobachtet, benötigte Nisin neben der Pyrophosphatgruppe ein weiteres Strukturmotiv zur Interaktion, um die Membran effektiv permeabilisieren können. Wie sowohl ihre als auch die Permeationsmessungen dieser Arbeit zeigten, muss dieses Motiv an der N-Acetylmuraminsäure lokalisiert sein. Damit zeigt sich eine weitere Parallele zum Aggregationsprozess, für den ebenfalls ein unbekann-

tes Strukturmotiv an der N-Acetylmuraminsäure von großer Bedeutung war. Es liegt nahe, zu vermuten, dass es sich um dasselbe Motiv handelt. Dies unterstützt die Ansicht, dass für Aggregation und Membranpermeation die gleichen molekularen Interaktionen zwischen Nisin und Lipid II verantwortlich sind.

Einen weiteren Hinweis lieferten die Messungen der Membranpermeation bei unterschiedlichen Nisin-zu-Lipid II-Konzentrationsverhältnissen. Bei einem Verhältnis von 30:1 war die Permeation deutlich schneller als bei einem Verhältnis von 4:1. Korrespondierend dazu nahm die Anzahl der Aggregate und ihre Größe mit einem größeren Nisinüberschuss zu. Nach 15 Minuten hatte bei einem Verhältnis von 30:1 bei fast allen GUVs eine vollständige Äquilibration mit der umgebenden Lösung stattgefunden. Bei einem Verhältnis von 4:1 war dies dagegen nur bei einigen GUVs der Fall. Bei den meisten GUVs war zwar ein Eindringen des Farbstoffes zu beobachten, aber keine vollständige Äquilibration wie bei einem höheren Nisinüberschuss.

Es stellt sich nun die Frage, ob die erhöhte Permeation tatsächlich von größeren Aggregaten verursacht wurde, wie die Messungen mit den Baktoprenolkomponenten nahelegten. Alternativ wäre es auch möglich, dass bei höherer Nisinkonzentration einfach nur die Zahl der Poren aus Nisin-Lipid II-Oligomeren zunahm und dadurch mehr Farbstoffmoleküle in kürzerer Zeit ins Innere der GUVs gelangen konnten. Dazu lassen sich einige theoretische Überlegungen anstellen.

Um die maximal mögliche Anzahl von Oligomeren in einem einzelnen GUV zu bestimmen, wird für ein durchschnittliches GUV ein Durchmesser von 20 μm angenommen. Ein solches GUV besteht aus ca. $2 \cdot 10^9$ Phospholipiden. Für die Messungen wurde ein Lipid II-Anteil von 0,2 mol% in die GUV-Membran integriert. Das entspricht einer Zahl von $4 \cdot 10^6$ Lipid II-Molekülen in dem besagten GUV. Bei gleichmäßiger Verteilung in der Membran befinden sich $2 \cdot 10^6$ Lipid II-Moleküle auf der Außenseite der Membran und sind für die Bindung an Nisin verfügbar. Geht man davon aus, dass zunächst 1:1 Nisin-Lipid II-Komplexe gebildet werden, lässt sich mit der von Wiedemann und Mitarbeitern an Lipid II-haltigen LUVs bestimmten Bindungskonstante $K_b = 2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ [133] der Grad der Lipid II-Komplexierung ausrechnen. Dabei wird ein möglicher Effekt der anstatt eines Puffers verwendeten Zuckerlösung auf das Bindungsverhalten von Nisin an Lipid II vernachlässigt. Es ergibt sich, dass bei Zusatz von 0,2 μM Nisin etwa 80 % der in der GUV Membran enthaltenen Lipid II-Moleküle komplexiert waren. Nach Zugabe zu der nisinhaltigen Lösung befanden sich also ca. $1,5 \cdot 10^6$ 1:1-Komplexe aus Nisin und Lipid II in der Membran des GUVs. Nach dem von Hasper und Mitarbeitern vorgeschlagenen Modell besteht eine Pore aus Oligomeren, die vier Lipid II- und acht Nisinmoleküle enthalten [142]. Glaubt man dieser Annahme, könnten maximal $3,5 \cdot 10^5$ Oligomere und damit Poren in der GUV-Membran gebildet werden, da in der Lösung genügend ungebundenes Nisin vorhanden wäre.

Die Zeit τ_0 , die von einer einzigen Pore benötigt wird, um eine Farbstoffäquibrierung zwischen dem Äußeren und dem Inneren der GUVs zu bewirken, kann zu

$$\tau_0 = \frac{\frac{4}{3}\pi R_{GUV}^3}{\sigma_0} \quad (3.1)$$

abgeschätzt werden [172]. Dabei ist σ_0 der spezifische Koeffizient der Transportkapazität, für den gilt

$$\sigma_0 = \frac{A_P D_0}{d} \quad (3.2)$$

mit dem Porenquerschnitt A_P , dem Diffusionskoeffizienten D_0 des Fluoreszenzmarkers beim Durchqueren der Pore und der Porenlänge d . Um A_0 zu bestimmen, wurde ein innerer Porendurchmesser von 2 nm angenommen. D_0 lässt sich bei bekannter Diffusion des Farbstoffes in Lösung mittels der Stokes-Einstein-Gleichung

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_{LY}} \quad (3.3)$$

aus dem Verhältnis des Porenradius R_{Pore} und dem Radius des Farbstoffes R_{LY} abschätzen [173]. Gilt wie hier $\frac{R_{Pore}}{R_{LY}} = 2$, so beträgt $D_0 = \frac{1}{5}D$. Wird weiterhin angenommen, dass die Porenlänge d gleich der Membrandicke von 4 nm ist, ergibt sich für τ_0 eine Zeit von 25 Minuten. In Gegenwart von 100 Nisin-Lipid II-Poren würde sich die Zeit bis zur Farbstoffäquibrierung auf nur 15 Sekunden verkürzen. Auf Grundlage des existierenden Porenmodells würde man also eine relativ hohe Zahl an Poren pro GUV und damit einen deutlich schnelleren Farbstofftransport als in den Permeationsexperimenten dieser Arbeit beobachtet erwarten.

Aufgrund dessen ist zu vermuten, dass vor allem die Größe der Aggregate die Effizienz der Permeation bestimmt. Es scheint plausibel, dass mit zunehmender Größe der Aggregate die Membranspannung und damit die Wahrscheinlichkeit zur Porenbildung zunimmt. Dass die Porenbildung durch amphipatische Peptide ein stochastischer Prozess ist, dessen Wahrscheinlichkeit bei zunehmender, lokaler Peptidkonzentration erhöht wird, wurde schon von Lee und Mitarbeitern gezeigt [174]. Dafür spricht auch, dass sich der Grad der Permeation stark zwischen einzelnen GUVs unterschied. Ein sehr heterogenes Verhalten der einzelnen GUVs trat auch bei der Vesikelabschnürung und dem plötzlichen Membrankollaps auf.

Zu der Aggregat- und Porenbildung trägt womöglich noch ein weiterer Effekt bei. Anders als in den Permeationsmessungen dieser Arbeit nahm bei Erhöhung des Nisin-zu-Lipid II-Konzentrationsverhältnisses über einen Wert von 2:1 die Effizienz der Membranpermeation in anderen Studien nicht zu [133, 142]. Diese Studien stützten sich auf fluoreszenzspektroskopische Messungen an großen, unilamellaren Vesikeln. Die in den Studien und in dieser

Arbeit verwendeten Modellsysteme weisen aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe (100 nm bei LUVs und 10-50 μm bei GUVs) Membrankrümmungen in ganz anderen Größenordnungen auf. Die Membrankrümmung ist in LUVs um das Hundertfache größer als in GUVs. Man kann nun vermuten, dass das Permeationsvermögen nicht nur von dem Nisin-zu-Lipid II-Verhältnis, sondern auch von der intrinsischen Krümmung beeinflusst wird. Dies führt vermutlich dazu, dass schon kleine Aggregate die Membran in LUVs sehr effektiv permeabilisieren.

4 Fazit und Ausblick

Charakteristisch für das Lantibiotikum Nisin ist die Bildung von großen Aggregaten in Gegenwart des bakteriellen Lipids Lipid II sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Bisherige Studien zum Wirkmechanismus von Nisin, die an Modellmembranen durchgeführt wurden, beschäftigten sich vor allem mit der Untersuchung des Permeationsmechanismus und des Versuchs der Strukturaufklärung der gebildeten Poren. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit der Aggregationsprozess von Nisin mittels fluoreszenzmikroskopischer Methoden wie konfokaler Laserrastermikroskopie und Lichtblattmikroskopie *in vivo* und an unilamellaren Riesenvesikeln untersucht.

Um die strukturellen Voraussetzungen der Aggregation zu identifizieren, wurde die Aggregatbildung von Nisin mit verschiedenen Baktoprenolkomponenten in der GUV-Membran quantitativ analysiert. Wie hier festgestellt wurde, ist für die Aggregationsfähigkeit von Nisin neben der Pyrophosphatgruppe des Baktoprenolbindungspartners außerdem noch ein weiteres Bindemotiv entscheidend. Die Messungen ergaben, dass sich dieses Strukturmotiv an der *N*-Acetylmuraminsäure des Lipid II-Moleküls befinden muss.

Die Aggregatgröße wurde als der entscheidende Parameter zur wirkungsvollen Membranstabilisierung identifiziert. Sowohl die durch Nisin induzierte Permeation als auch die Deformation der Lipiddoppelschicht von unilamellaren Riesenvesikeln korrelierten mit der Größe der Aggregate. Einen Einfluss auf die Größe der Aggregate hatten zum einen der Nisinbindungspartner und zum anderen das Konzentrationsverhältnis von Nisin zu seinem Bindungspartner. Der Aggregationsprozess selbst wurde in dieser Arbeit mittels 2-dimensionaler Einzelmolekülverfolgung unter Verwendung eines Lichtblattmikroskops in der Membran der GUVs beobachtet. Es wurden Aggregate aus Hunderten bis zu Hunderttausenden Lipid II-Molekülen gebildet.

Die *in vivo*-Messungen zeigten, dass die Toxizität von Nisin ebenfalls mit der Aggregatgröße korreliert, und erst ab einer Mindestgröße der Zelltod eintrat. Dies zeigt, dass die in Modellmembranen beobachteten Membraneffekte für den Wirkmechanismus von Nisin von entscheidender Bedeutung sind. Zusätzlich zu den Permeationseffekten ist zu erwarten, dass die durch die Aggregation gestörte Lipidordnung in der Membran auch zu Fehlfunktionen der Zellwandbiosynthesemaschinerie führt. Zusammengefasst sprechen folgende Ergebnisse dieser Arbeit für eine biologische Relevanz großer Nisin-Lipid II-Aggregate: (i) die starke Korrelation zwischen der Aggregatgröße, dem Zelltod der Bakterien und der Membranpermeation, (ii) das schnelle Wachstum von Nisin-Aggregaten, die zwischen Hunderte und Hunderttausende Lipid II-Moleküle enthielten, und (iii) die relativ langsame Permea-

tion der Lipid II-haltigen GUVs in Gegenwart einer sehr hohen Anzahl an Nisin-Lipid II-Komplexen. Deshalb sollte das bisher gültige Modell der Porenbildung von Hasper und Mitarbeitern [142] weiter überprüft werden.

Auf Grundlage von experimentellen und theoretischen Studien der Interaktion von antimikrobiellen Peptiden mit Modellmembranen kann man versuchen, den Aggregationsprozess physikochemisch zu verstehen. Spekulativ lässt sich ein solcher Prozess so beschreiben: vermutlich führt die durch die Aggregation von Nisin bewirkte Segregation von Lipid II zunächst zu einer Phasentrennung in eine Lipid II-arme und eine Lipid II-reiche Phase. In den Lipid II-reichen Phasen würde die asymmetrische Insertion von Nisin dann vermutlich eine Expansion der äußeren Schicht der Lipiddoppelschicht bewirken. Als Konsequenz der steigenden Membranspannung würde es zunächst zu einer Porenbildung kommen. Die außerdem beobachtete Formumwandlung in Form von „Vesikelknospung“ träte als Folge einer Minimierung der Biegeenergie der Membran aufgrund der asymmetrischen Bindung von Nisin an die GUV-Membran auf.

Eine präzise Beschreibung der Wechselwirkungen, die die Aggregation der zunächst gebildeten Nisin-Lipid II-Komplexe begünstigen, ist immer noch nicht möglich. Gerichtete, spezifische Wechselwirkungen zwischen den Komplexen scheinen unwahrscheinlich, da sich dann nur kleine Oligomere bilden würden. Die Art der Wechselwirkungen zwischen den Komplexen ließe sich aber mittels Molekulardynamikuntersuchungen wie von Kandt und Mitarbeitern [156] weiter untersuchen.

Noch genauere Erkenntnisse über die tatsächlichen Aggregatgrößen und die Kinetik des Aggregatwachstums könnten mittels 3-dimensionaler Partikelverfolgung [151] erhalten werden. Mit dieser Methode lassen sich sehr lange Trajektorien aufnehmen, die eine genaue Bestimmung der Diffusionskoeffizienten einzelner Moleküle ermöglichen. Damit lassen sich zum einen den einzelnen Partikeln definierte Größen zuordnen. Zum anderen können durch Veränderungen der Mobilität während der Beobachtungszeit Übergänge zwischen verschiedenen Zuständen nachgewiesen werden. Zusätzlich ließen sich durch Messung des Energietransfers (Förster energy resonance transfer, FRET) zwischen einzelnen Nisin- und Lipid II-Molekülen Bindeereignisse von Nisin an Lipid II beobachten. Eine dadurch hervorgerufene Änderung der Mobilität könnte unmittelbar analysiert werden.

5 Methoden

5.1 Aufreinigung und Markierung von Nisin

Nisin Z wurde aufgereinigt und fluoreszenzmarkiert von Dr. Imke Wiedemann zur Verfügung gestellt. Dafür wurde es zunächst mittels Chloroformextraktion und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high-performance liquid chromatography, HPLC) aus dem Kulturüberstand von *L. lactis* extrahiert [175, 176]. Zur Fluoreszenzmarkierung wurde der Farbstoff Alexa Fluor 647 (AF647) an die C-terminale Carboxylgruppe von Nisin gekoppelt (Abbildung 5.1). Dafür wurde als Hydrazid funktionalisiertes AF647 verwendet. Für die Reaktion wurden 5 mg Nisin in 1 mL MES-Puffer (0,1 mM, pH 4,7-5,5) gelöst, 1 mg AF647-Hydrazid in 60 μ L DMSO vorgelöst und zu 0,5 mL der Nisinlösung gegeben. Um die Carboxylgruppe des Peptids zu aktivieren, wurde eine frische Lösung (500 mM) des wasserlöslichen Carbo-diimids 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) in MES-Puffer hergestellt und 14 μ L davon zu der Reaktionslösung gegeben. Diese wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nisin-AF647 wurde mittels HPLC auf einer C18-Säule unter Verwendung eines linearen Gradienten von Puffer A (Wasser, 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA)) zu Puffer B (Acetonitril, 0,1 % TFA) aufgereinigt.

5.2 Aktivitätsuntersuchung von markiertem Nisin

Um die Aktivität von markiertem Nisin-AF647 und nativem Nisin zu vergleichen, wurde eine Empfindlichkeitsbestimmung gegenüber *B. subtilis* durchgeführt. Dafür wurde aus einer Übernachtskultur eine frische Suspensionskultur der Bakterien in 100 mL LB (lyso-geny broth)-Medium hergestellt. Die Suspensionskultur wurde unter Schütteln bei 37 °C inkubiert, bis die Zellen zu einem $OD_{600} = 0,3$ gewachsen waren. Je 50 μ L einer 1:10⁶ Verdünnung der Kultur in LB-Medium wurden in die Vertiefungen einer sterilen 96-Loch-Titerplatte gegeben. Dazu wurden immer jeweils 50 μ L einer Nisin- oder Nisin-AF647-haltigen Lösung in LB-Medium gegeben. Es wurden für Nisin und Nisin-AF647 dieselben, sieben verschiedenen Nisinkonzentrationen im Bereich zwischen 0 und 15 μ M getestet. Die Mikrotiterplatte wurde unter leichtem Schütteln bei 37 °C über Nacht inkubiert. Es wurde per Auge anhand der Trübung des Mediums bestimmt, in welchen Vertiefungen Bakterien gewachsen waren.

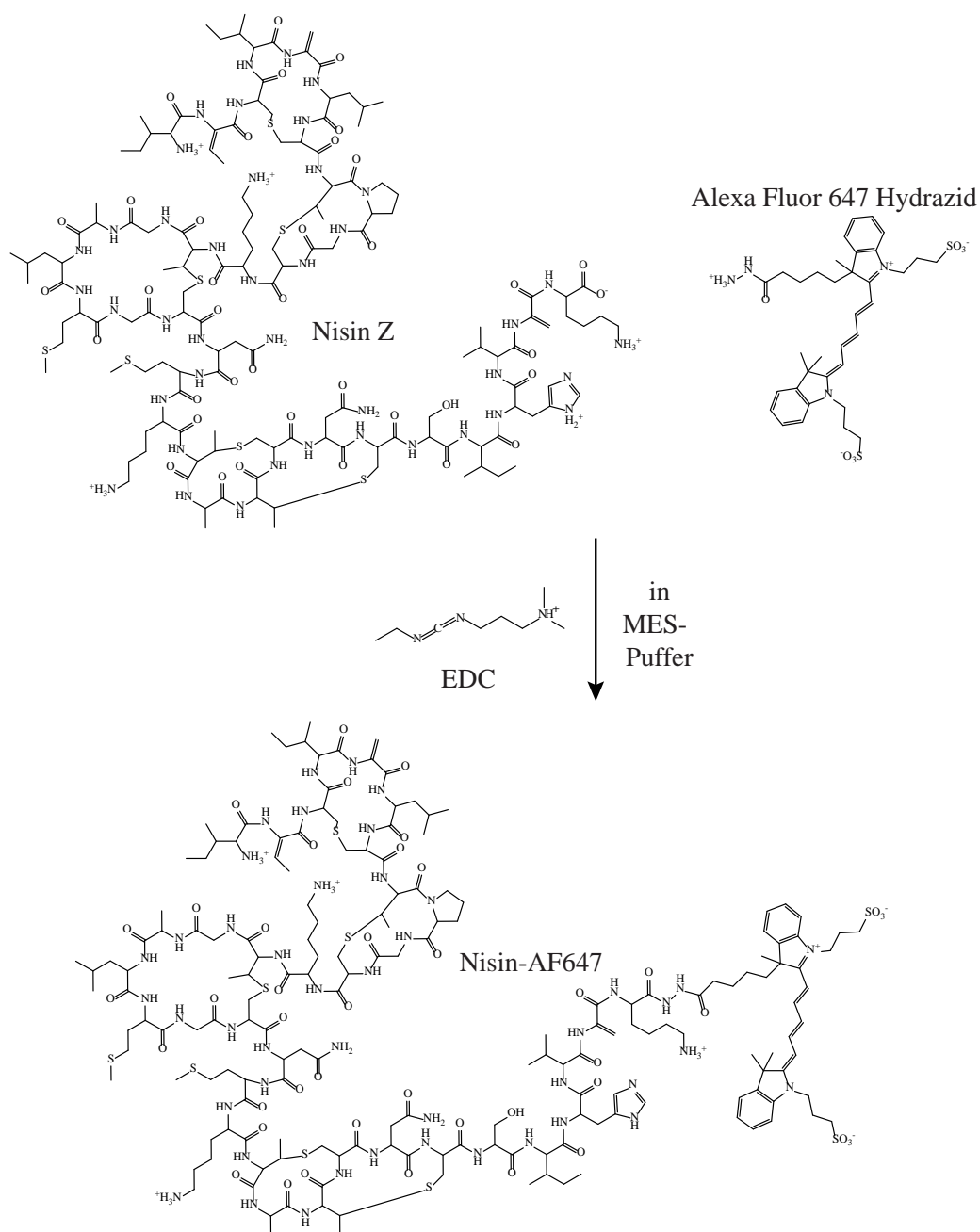


Abbildung 5.1: Reaktion von Nisin Z mit Alexa Fluor 647-Hydrazid. Nach Aktivierung der Carboxylgruppe mittels EDC wurde der C-Terminus von Nisin spezifisch markiert.

5.3 Präparation von Lipid II und seinen Derivaten

Lipid II, der membrangebundene Träger der Peptidoglykaneinheit, wurde von der Arbeitsgruppe Sahl zur Verfügung gestellt. Lipid II wurde *in vitro* wie von Schneider und Mitarbeitern beschrieben synthetisiert und aufgereinigt [177]. Dafür wurde die enzymatische Aktivität von Membranpräparationen von *M. luteus* ausgenutzt, um C₅₅-P unter Zusatz von Uridindiphosphat-N-Acetylmuraminsäurepyrophosphat (UDP-MurNAc-PP) und UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) zu Lipid II umzusetzen. Die Synthese von Lipid I wurde analog durchgeführt, jedoch ohne dass der Reaktion UDP-GlcNAc zugefügt wurde. Die Syntheseprodukte wurden in Butanol/6M Pyridin extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie (DC) aufgereinigt. Mittels Phosphattest nach Rouser [178] wurde die Konzentration der Lipide bestimmt.

5.4 Fluoreszenzmarkierung der Lipide

Typischerweise werden zur Fluoreszenzmarkierung von Biomolekülen kommerziell erhältliche NHS-Ester-Farbstoffe kovalent an primäre Aminogruppen gekoppelt. In dieser Arbeit wurden für die Markierung von Phospholipiden Phosphatidylethanolamine verwendet, die als Kopfgruppe ein primäres Amin besitzen. Natives Lipid II besitzt mit einer Lysingruppe ebenfalls ein primäres Amin an seiner Kopfgruppe, das für die Reaktion geeignet ist.

5.4.1 Markierung von Phospholipiden

30 nmol 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin und die äquimolare Menge des entsprechenden Farbstoffes (Alexa Fluor 546-NHS-Ester (AF546) oder Atto 647-NHS-Ester (Atto647)) wurden zunächst in 50 µL einer Lösung aus Chloroform/Methanol (2:1, v/v) miteinander vermischt. Unter Zugabe von 15 molaren Äquivalenten Triethylamin zur Deprotonierung der Aminogruppe wurde die Reaktion für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Markierte und unmarkierte Lipide wurden mittels präparativer DC unter Verwendung von Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4, v/v/v) als Laufmittel getrennt (Abbildung 5.2 A). Primäre Amine, also nicht reagierte PE-Lipide, wurden mit einer Ninhydrin-Sprühlösung angefärbt. Die das markierte Lipid enthaltende Bande wurde von der Chromatographiefolie gekratzt und das Reaktionsprodukt mit Methanol aus dem Kieselgel extrahiert.

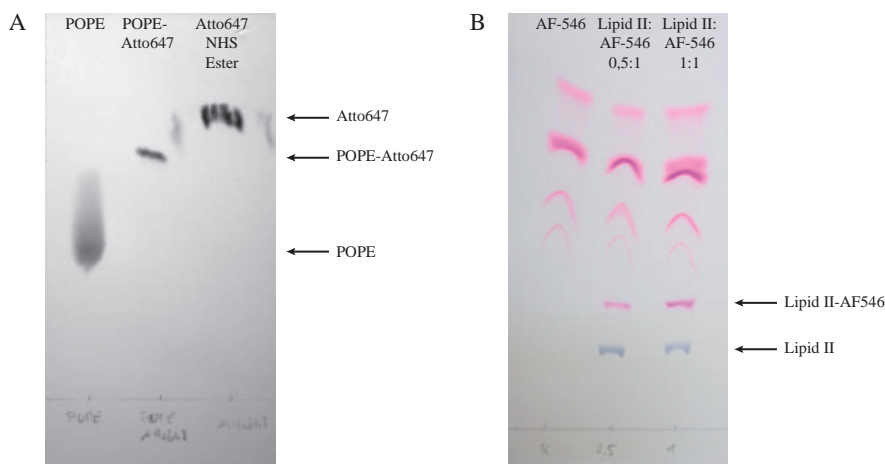


Abbildung 5.2: Dünnschichtchromatographie. (A) Kontrolle der Reaktion von POPE mit Atto647-NHS-Ester. Links: POPE; Mitte: Reaktionsprodukt POPE-Atto647; rechts: reiner Farbstoff Atto 647-NHS-Ester. (B) Aufreinigung von Lipid II-AF546. Links: reiner Farbstoff AF546-NHS-Ester; Mitte und rechts: Reaktionslösung mit Edukten (AF546-NHS-Ester und Lipid II) und Produkten (Lipid II-AF546).

5.4.2 Markierung von Lipid II

Lipid II wurde mit Atto 488-NHS-Ester (Atto488) markiert, indem die *in vitro*-Synthese mit UDP-MurNAc-Pentapeptid-Atto488 anstelle des unmarkierten Substrats durchgeführt wurde. UDP-MurNAc-Pentapeptid-Atto488 wurde von Dr. Imke Wiedemann zur Verfügung gestellt. Dafür wurde UDP-MurNAc-Pentapeptid, das aus *Staphylococcus simulans* 22 wie von Kohlrausch und Höltje beschrieben [179] isoliert und aufgereinigt worden war, in 0,1 M Natriumcarbonat/Acetonitril-Lösung (1:1, v/v) gelöst. Es wurde schrittweise eine Lösung von Atto 488-NHS-Ester (4 mg/mL) zugegeben, sodass ein molares Verhältnis von UDP-MurNAc-Pentapeptid zu Atto488-NHS-Ester von 2:1 eingestellt wurde. Die Reaktionslösung wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4 °C unter konstantem Schwenken inkubiert. Das Reaktionsprodukt wurde mittels HPLC aufgereinigt. Dazu wurde die Reaktionslösung auf eine C18-Säule aufgetragen und das Produkt mit folgendem Puffergradienten eluiert: in 10 Minuten von 0 % auf 20 % B; 10 Minuten isokratisch bei 20 % B; in 10 Minuten von 20 % zu 100 % B (Puffer A: 50 mM Ammoniumdicarbonat; Puffer B: Methanol). Die UDP-MurNAc-Pentapeptid-Atto488 enthaltenden Fraktionen wurden gefriergetrocknet und bei –20 °C aufbewahrt.

Lipid II-AF546 und Lipid II-Atto647 wurden von Dr. Fabian Grein zur Verfügung gestellt. Da nur kleine Mengen (< 1 nmol) zur Einzelmolekülverfolgung in GUVs benötigt wurden, wurde Lipid II durch direkte Reaktion mit AF546-NHS-Ester oder Atto647-NHS-Ester an der Lysingruppe markiert. Dazu wurden 5 nmol Lipid II mit 2,5 molaren Äquivalenten des Farbstoffs in einer Lösung aus Chloroform/Methanol/*N,N*-Diisopropylethylamin (5:5:1, v/v/v) für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Mittels

präparativer DC wurde das Reaktionsprodukt von unmarkiertem Lipid II getrennt (Abbildung 5.2 B). Dabei wurde als Laufmittel eine Lösung aus Chloroform/Methanol/Wasser/Ammoniak (88:48:10:1) verwendet. Die das markierte Lipid enthaltende Bande wurde von der Chromatographiefolie gekratzt und das Reaktionsprodukt mit Methanol aus dem Kieselgel extrahiert.

5.5 Vesikelpräparation

5.5.1 Präparation unilamellarer Riesenvesikel

Unilamellare Riesenvesikel wurden mit der Methode der Elektroformation präpariert [29]. Dazu wurde zunächst eine 1,3 mM Mischung der entsprechenden Lipide in Chloroform hergestellt. Die Probenkammer wurde aus gereinigten, mit Indiumzinnoxid (indium tin oxide, ITO) beschichteten Gläsern gefertigt. Zur Reinigung wurden die ITO-Gläser im Ultraschallbad für 15 Minuten mit 0,1 M Natronlauge inkubiert, mit deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend mit Aceton gereinigt. Jeweils zwei Deckgläser wurden auf ihren leitfähigen Seiten am Rand mit klebendem Kupferband verbunden. Ein solches Paar diente als Unterseite der Probenkammer und ein weiteres als Oberseite. Auf jedes der ITO-Gläser wurden 20 μL der Lipidlösung gegeben und das Chloroform verdampft. Als Kammerwände dienten O-Ringe aus Teflon-ummanteltem Viton, auf die vorher zur Abdichtung eine dünne Schicht Silikonvakuumfett aufgetragen wurde. Die Kammer wurde mit 275 μL einer 250 mM Saccharoselösung gefüllt. Zur Elektroformation der GUVs wurde eine Wechselspannung von 1,2 V mit einer Frequenz von 12 Hz angelegt, indem die Kupferbänder an einen Pulsgenerator angeschlossen wurden. Die Elektroformation wurde für 4 Stunden bei 45 °C durchgeführt.

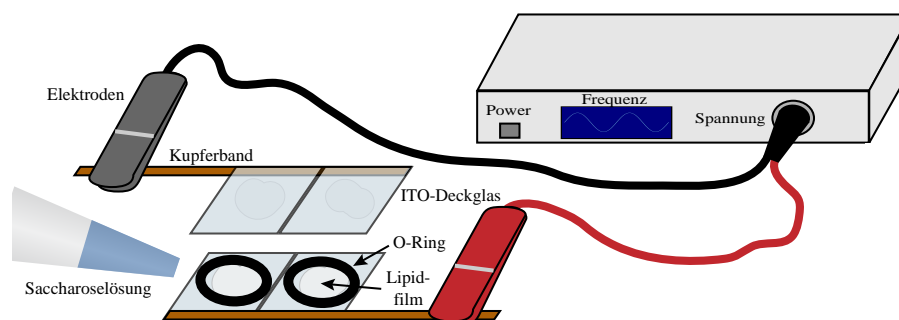


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung der Elektroformationsmethode.

5.5.2 Präparation großer, unilamellarer Riesenvesikel

Große, unilamellare Vesikel mit einem Durchmesser von 100 nm wurden mit der Extrusionstechnik präpariert [180]. Dazu wurde zunächst in Chloroform die entsprechende Lipidmischung hergestellt. Für das spektroskopische Ausströmxperiment (Abschnitt 5.7) wurde eine Mischung aus DOPC und 0,05 mol% Lipid II verwendet. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom entfernt und der getrocknete Lipidfilm in 300 μ L Puffer (50 mM MES, 100 mM Natriumsulfat, pH 5,5) resuspendiert. Dem verwendeten Puffer wurde Carboxyfluorescein in einer selbstlöschenden Konzentration (50 mM) zugegeben. Das Carboxyfluorescein wurde dafür in 1 M Natriumhydroxidlösung vorgelöst und entsprechend verdünnt. Zum Resuspendieren des Lipidfilms wurde die Flüssigkeit auf einem Schüttler gründlich durchmischt und das Gefäß zwischendurch im Wasserbad bei 30 °C geschwenkt, bis sich der Lipidfilm vom Boden des Gefäßes gelöst hatte. Die Suspension von multilamellaren Vesikeln wurde daraufhin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und unter leichtem Schwenken im Wasserbad langsam wieder aufgetaut. Der Vorgang wurde 8-10 mal wiederholt. Um unilamellare Vesikel einheitlicher Größe zu erhalten, wurde die Suspension 21 mal durch eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 100 nm mit Hilfe eines Mini-Extruders extrudiert. Nach dem Extrudieren wurde der nicht eingeschlossene Farbstoff mittels Gelfiltration entfernt. Zur Präparation der Säule wurde eine Suspension von 1 g Säulenmaterial in 25 mL des verwendeten Puffers kurz erhitzt und das Säulenmaterial für eine Stunde vollständig hydratisiert. Die Säule wurde zweimal mit dem Puffer gewaschen und dann mit dem Säulenmaterial befüllt. Nachdem sich das Material vollständig gesetzt hatte, wurde die überschüssige Flüssigkeit abgelassen, die Vesikelsuspension aufgetragen und die vesikelhaltige Fraktion aufgefangen. Bis zum Start der Messung wurden die Liposomen auf Eis gelagert.

5.6 Bakterienkultur für die Mikroskopie

Für die Mikroskopie wurden Zellen von *B. subtilis* verwendet. Aus einer Glycerinkultur wurden 100 mL LB-Medium angeimpft. Die Zellen wurden als Suspensionskultur über Nacht unter Schütteln bei 37 °C kultiviert. Eine neue Suspensionskultur wurde hergestellt, indem 1 mL der Übernachtskultur in 100 mL LB-Medium gegeben wurden. Die Zellen wurden unter Schütteln bei 37 °C bis zu einem $OD_{600} = 0,3$ kultiviert.

5.7 Fluoreszenzspektroskopische Messungen

Die Messungen wurden an einem Fluoreszenzspektrometer LS55 der Firma PerkinElmer (Waltham) durchgeführt. Die wie in Abschnitt 5.5.2 beschriebenen präparierten Vesikellösung

wurde in eine Glasküvette gegeben. Die Carboxyfluorescein-Fluoreszenz wurde mit einer Wellenlänge $\lambda_{ex} = 490$ nm angeregt und über einen Zeitraum von 6 Minuten bei einer Wellenlänge $\lambda_{em} = 525$ nm detektiert. Nach 50 s wurden jeweils Nisin oder Nisin-AF647 mit einer Endkonzentration von 1 μ M zugegeben. Um einen Referenzwert für die vollständige Membranpermeation zu erhalten, wurde die Membran nach beendeter Reaktion mit Nisin durch Zugabe von 1 % (v/v) Triton-X100 restlos permeabilisiert.

5.8 Mikroskopische Methoden

5.8.1 Fluoreszenzmikroskopie von Bakterien

Für die Messungen an Bakterienzellen wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop verwendet, das auch über eine Beleuchtung zur internen Totalreflexionsmikroskopie verfügte (total internal reflexion fluorescence microscopy (TIRF)) [181]. Zur Fluoreszenzanregung von SYTOX Green wurde ein Laser der Wellenlänge $\lambda_{ex} = 488$ nm (Sapphire-100, Coherent) und für die Fluoreszenzanregung von Nisin-AF647 ein Laser der Wellenlänge $\lambda_{ex} = 640$ nm (Cube640-40C, Coherent) verwendet. Das Fluoreszenzlicht wurde unter Verwendung eines dichroischen Filters (HFT 480/640) mit einem Ölobjektiv (Alpha-Planfluar, 100x/1.45, Carl Zeiss MicroImaging GmbH) mit einer sensitiven EMCCD-Kamera (iXON DV 860-BI, Andor) detektiert. Mit einer Kamerapixelgröße von 16 x 16 μm^2 und einer zusätzlichen, 4fachen Vergrößerung ergab sich ein Aufnahmebereich von 20,5 x 20,5 μm^2 mit einer Pixelgröße von 40 nm in der Objektebene.

Zunächst wurden Bakterienzellen von *B. subtilis* wie in Abschnitt 5.6 beschrieben kultiviert. Um das Medium zu entfernen, wurden 1 mL der Kultur bei 12.000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert und in einem Zehntel des Ausgangsvolumens resuspendiert. Zum Resuspendieren wurde M9-Minimalmedium verwendet. Die Zellen wurden für 5 Minuten mit Nisin-AF647 mit einer Endkonzentration von 1,5 μ M inkubiert. 1 μ L dieser Zellsuspension wurde auf ein Agarosekissen gegeben (Abbildung 5.4). Die Agarosekissen wurden hergestellt, indem eine 1%ige Agaroselösung in der Mikrowelle kurz zum Kochen erhitzt und auf 40 °C abgekühlt wurde. Zu der Agaroselösung wurde SYTOX Green mit einer Endkonzentration von 50 nM gegeben, die Lösung gut durchmischt und 1 mL der noch flüssigen Agaroselösung zwischen 2 Deckgläser (2,5 x 2,5 cm^2) gegeben. Nach Abkühlen wurde aus dem Gel mit einem Skalpell ein Kissen passender Größe geschnitten. SYTOX Green diente zur Identifizierung von Bakterienzellen mit beschädigter Zellmembran [147]. Nachdem die Flüssigkeit der Bakterienzuspension von dem Agarosekissen aufgenommen worden war und die Bakterienzellen somit auf der Oberseite des Agarosekissen immobilisiert waren, wurde das Kissen umgedreht in eine kommerziell erhältliche Glasboden-Petrischale gelegt (Abbildung 5.4). An jeder Probenposition wurden jeweils drei Filme, im Durchlichtkanal

und mit Fluoreszenzanregung bei $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ und $\lambda_{ex} = 640 \text{ nm}$, mit 30 Bildern bei einer Bildrate von 95 Hz im Bildübertragungsmodus und einer 2 x 2 Pixelzusammenfassung aufgenommen.

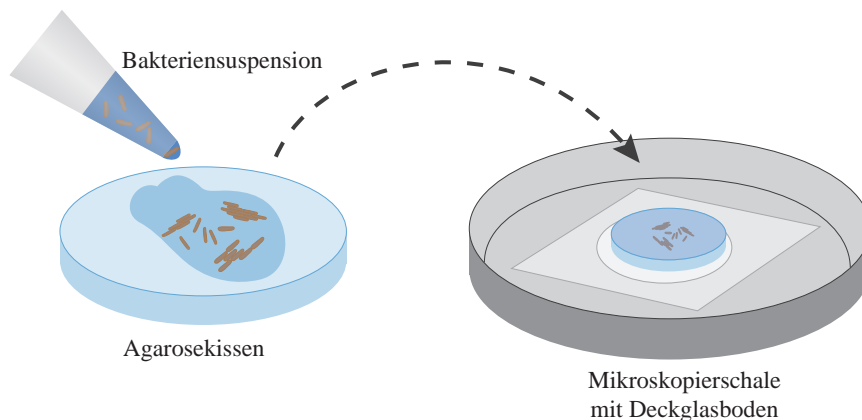


Abbildung 5.4: 1 μL der mit Nisin-AF647 inkubierten Suspension von *B. subtilis* wurde auf ein Agarosekissen gegeben. Nach kurzer Zeit war der Flüssigkeitsfilm getrocknet und die Bakterienzellen auf der Oberfläche des Kissens immobilisiert. Zum Mikroskopieren wurde das Agarosekissen umgedreht in eine Mikroskopierschale mit Deckglasboden gelegt.

5.8.2 Konfokale Laserrastermikroskopie

Die Bildung der GUVs, der erfolgreiche Einbau von markierten Lipidmolekülen und die Interaktion zwischen GUVs und Nisin-AF647 sowie die Translokation von Fluoreszenzfarbstoffen wurden mittels konfokaler Laserrastermikroskopie unter Verwendung eines LSM 510 Meta (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) bei Raumtemperatur beobachtet. Dieses war mit einem Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss C-Apochromat, 40x/1.2, Corr) und einem Luftobjektiv (Zeiss Plan-Neofluar, 20x/0.5) ausgestattet. LuciferYellow (LY) und Lipid II-Atto488 wurden mit Licht eines Argonionenlasers der Wellenlänge von $\lambda_{ex} = 458 \text{ nm}$ und $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ und Nisin-AF647 mit Licht eines Helium-Neon-Lasers der Wellenlänge $\lambda_{ex} = 633 \text{ nm}$ angeregt. Die Laserstrahlen wurden durch einen dichromatischen Farbteller (UV/488/543/633) auf die Probe gelenkt. Zur Detektion der Fluoreszenz wurden ein zweiter dichromatischer Farbteller (545) und zwei Emissionsfilter (BP505-550 und LP650) verwendet. Für vergleichende Messungen wurden immer dieselben Intensitäts- und Detektoreinstellungen gebraucht.

Für die Messungen wurden zunächst Glucoselösungen mit entsprechenden Farbstoff- und Nisinkonzentrationen hergestellt, um eine homogene Verteilung der Moleküle in der Lösung zu gewährleisten. Zu diesen Lösungen wurden GUVs in einer Verdünnung von 1:5 gegeben. Der Start der Aufnahme erfolgte fünf Minuten nach GUV-Zugabe, als die GUVs aufgrund des Dichteunterschieds zwischen der eingeschlossenen Saccharoselösung und der

umgebenden Glucoselösung auf den Probenkammerboden gesunken waren und dort stabil liegen blieben. Für die konfokale Laserrastermikroskopie wurden kommerziell erhältliche Glasboden-Petrischalen als Probenkammern verwendet.

Messung der Membraninteraktion

Für Bindungsstudien von Nisin-AF647 an die GUV-Membranen wurden Verdünnungen in 250 mM Glucoselösung oder ionenhaltiger Glucoselösung (125 mM Glucose, 30 mM MES, 35 mM Na₂SO₄, pH = 5,8) mit einer Endkonzentration von 0,2 oder 1,5 μ M Nisin-AF647 hergestellt. Es wurden GUVs aus DOPC hinzugegeben, in die 20 mol% DOPG und/oder 0,2 mol% C₅₅-P, C₅₅-PP, Lipid I und Lipid II integriert waren. Um die Interaktion mit Lipid II zu visualisieren, wurden GUVs verwendet, die 0,2 mol% Lipid II-Atto488 enthielten. Für die Aufnahmen wurde das Wasserimmersionsobjektiv verwendet.

Messung der Membranpermeation

Die Fähigkeit von Nisin, die Membran zu permeabilisieren, wurde anhand der Translokation des Farbstoffes LuciferYellow (LY) untersucht. LY ist ein kleiner, polarer Farbstoff, der eine intakte Membran nicht passieren kann. Es wurde den Glucoselösungen zusätzlich zu Nisin mit einer Endkonzentration von 30 μ M hinzugefügt. Für die Translokationsexperimente wurden GUVs aus DOPC zugegeben, die 20 mol% DOPG und/oder 0,2 mol% C₅₅-P, C₅₅-PP, Lipid I und Lipid II enthielten. Der Farbstoff, der sich in der umgebenden Lösung befand, konnte nur ins Innere der Vesikel gelangen, wenn sich Poren in der Membran bildeten. Für die Aufnahmen wurde das Luftobjektiv verwendet.

5.8.3 Lichtblattmikroskopie

Für die Messungen der Lipidmobilität wurde ein in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes Lichtblattmikroskop verwendet [153, 151]. Die speziell angefertigten Probenküvetten mit Deckglasboden (Abbildung 5.5 A) wurden vor jedem Experiment in 2 %iger (v/v) Hellmanex-Lösung gereinigt und im Argon-Strom getrocknet. Der Probenhalter war mit einem Piezo-Positioniersystem (Physik Instrumente) motorisiert, um die GUVs im Lichtblatt zu platzieren. Die Fluoreszenz wurde durch Beleuchtung mit einem dünnen Lichtblatt mit einer Dicke $< 2,2 \mu$ m (Halbwertsbreite) senkrecht zur Detektionsachse angeregt. Um einen größeren Bereich gleichmäßig auszuleuchten, konnte die Dicke des Lichtblatts auf 10 μ m erhöht werden. Zur Fluoreszenzanregung standen drei Laserlinien ($\lambda_{ex} = 488$ nm, Sapphire-100 und $\lambda_{ex} = 640$ nm, Cube640-40C, Coherent; $\lambda_{ex} = 532$ nm, LasNova GLK 3250 T01, Lasos) zur Verfügung. Die Fluoreszenz wurde senkrecht zur Anregung durch den Glasboden der Probenkammer detektiert. Die zur Detektion verwendeten Filter, Objektive und Kameras

wurden passend je nach Anwendung gewählt. Zur Zwei-Kanal-Detektion konnte ein Bildteiler (OptoSplit II, Cairn Research Ltd), ausgestattet mit entsprechenden Filtern, vor den Kameras montiert werden. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (20 °C) durchgeführt. Vor jeder Messung wurde mittels einer Kalibrierlösung aus in Wasser gelöstem Fluoreszenzfarbstoff das Lichtblatt in die Probenkuvette fokussiert (Abbildung 5.5 B) und der Detektionsfokus so ausgerichtet, dass sich beide Beleuchtungs- und Detektionsfokus überlagerten.

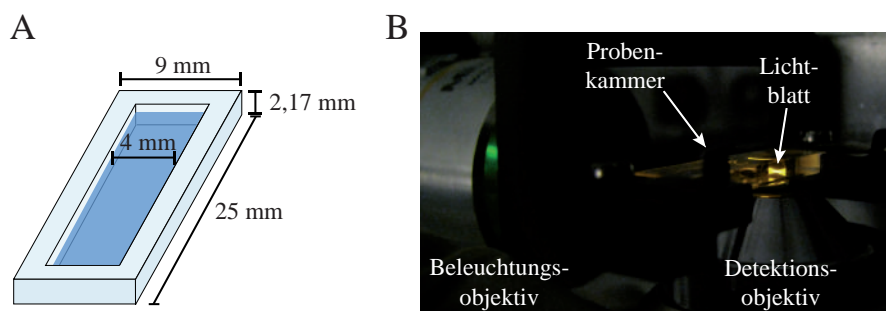


Abbildung 5.5: (A) Schematische Darstellung der Probenkuvette. (B) Fotografie des Lichtblatts (gelb), das von links durch das Beleuchtungsobjektiv in die Probenkuvette fokussiert wurde. Die Fluoreszenz wurde senkrecht dazu von unten durch den Kammerboden mit verschiedenen Objektiven detektiert.

Zur Durchführung aller Messungen wurden zunächst wie für die konfokale Laserrastermikroskopie Glucoselösungen mit entsprechenden Farbstoff- und Nisinkonzentrationen hergestellt. Zu diesen Lösungen wurden GUVs in einer Verdünnung von 1:8,25 gegeben. Der Start der Aufnahme erfolgte fünf Minuten nach GUV-Zugabe, als die GUVs aufgrund des Dichteunterschieds zwischen der eingeschlossenen Saccharoselösung und der umgebenden Glucoselösung auf den Probenkammerboden gesunken waren und dort stabil liegen blieben.

Einzelmolekülmessungen

Die für die Einzelmolekülmessungen verwendeten GUVs bestanden aus POPC mit und ohne Zusatz von 0,2 mol% Lipid II und enthielten zusätzlich 10^{-6} mol% Lipid II-Atto647 oder POPE-Atto647. Um die Änderung der Mobilität von Lipid II-Atto647 in Lipid II-haltigen POPC-GUVs nach Zugabe von Nisin zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Nisinkonzentrationen verwendet. Das Nisin-zu-Lipid II-Verhältnis entsprach für die niedrigere Nisinkonzentration von 0,2 μ M einem Wert von 4:1 und für die höhere Konzentration von 1,5 μ M einen Wert von 30:1. Für jede experimentelle Bedingung wurden sechs Proben präpariert, in denen jeweils 3-5 GUVs vermessen wurden. Die Dauer der Messungen betrug 20 Minuten. Das Fluoreszenzlicht wurde durch den Deckglasboden der Probenkammer unter Verwendung eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur (CFI Apo LWD

Lambda S 40x/1.15) gesammelt, mittels entsprechender Notch- (NF01-633-U-23.7-D, Semrock) und Bandpassfilter (z532/640m, Chroma) gefiltert und mit einer sensitiven EMCCD (electron-multiplying charge coupled device)-Kamera (iXon DV-860, Andor Technology) detektiert. Eine zusätzliche, 2,5fache Vergrößerung resultierte in einer Pixelgröße von 240 nm. Es wurden Filme mit jeweils 2000 Bildern bei einer Bildrate von 95 Hz im Bildübertragungsmodus aufgenommen. Zur Verstärkung des elektronischen Signals wurde ein Faktor von 250 eingestellt.

Messung der Membranpermeation

Für die Translokationsmessungen wurden GUVs aus POPC mit Zusatz von 0,2 mol% Lipid II verwendet. Die Glucoselösungen enthielten Nisin-AF647 mit einer Endkonzentration von 0,2 μM oder 1,5 μM und LY mit einer Endkonzentration von 20 μM . Es wurde ein Objektiv mit geringer Vergrößerung (Plan Fluor 20x/0.50, Nikon) verwendet, um einen großen Probenausschnitt abzubilden. Die Fluoreszenz wurde mit einer pco.edge sCMOS Kamera (pco.edge, PCO) unter Verwendung des entsprechenden Notchfilters (NF01-488-U-23.7-D, Semrock) detektiert. Die Messungen wurden 5 Minuten nach Zugabe der GUVs gestartet. Über einen Zeitraum von 20 Minuten wurde alle 30 Sekunden ein Bild aufgenommen.

Volumetrische Messungen

Um die nisininduzierte Vesikelabschnürung in Lipid II-haltigen POPC-Vesikeln abzubilden, wurde die Membran durch den Einbau von 0,1 mol% POPE-AF546 visualisiert. Mit einem Objektiv geringer Vergrößerung (CFI Plan Fluor 10x/0.30) wurden die Vesikel volumetrisch mit einer pco.edge sCMOS Kamera (pco.edge, PCO) abgebildet. Bildstapel wurden aufgenommen, indem die Probenkammer durch das Lichtblatt bewegt wurde und im Abstand von 1 μm jeweils ein Bild detektiert wurde. Die gesamte Aufnahmezeit für einen Bildstapel betrug 4 s. Um den Vesikelradius als Funktion der Zeit zu bestimmen, wurde über einen Zeitraum von 20 Minuten ein Bildstapel pro Minute aufgenommen.

Zur gleichzeitigen Detektion zweier Farbstoffe (POPE-AF546 und Nisin-AF647) auf dem Kamerachip wurde der Bildteiler vor der Kamera eingesetzt. Mittels eines dichroischen Spiegels (FF662-FDi01-25x36, Semrock) wurde das Fluoreszenzlicht abhängig von der Wellenlänge auf zwei Kanäle aufgespalten und unter Verwendung eines Bandpassfilters (ET560/80M, Chroma) auf dem Kamerachip abgebildet. Die Bildteilung wurde so justiert, dass der Kamerachip voll ausgeleuchtet und die beiden spektral getrennten Bilder gleich große Bereiche einnahmen.

5.9 Datenanalyse

5.9.1 Translokationsanalyse

Die Translokation von LY über die GUV-Membranen wurde mit Hilfe des Programms ImageJ [182] analysiert. Um GUVs mit einem Radius kleiner als 20 μm von der weiteren Analyse auszuschließen, wurden mittels des Partikelanalysewerkzeugs GUVs mit einem Radius größer als 20 μm identifiziert. Dazu wurde ein Intensitätsschwellenwert festgelegt, durch den sich die GUVs (geringe Intensität) von der umgebenden Lösung (hohe Intensität) unterscheiden ließen. Dies funktionierte in der Regel sehr gut, da zu Beginn der Messung der Intensitätsunterschied zwischen Vesikelinnerem und -äußeren groß war. Für die identifizierten GUVs wurde ein mittlerer Wert für die Intensität der Fluoreszenz innerhalb, F_{innen} , und außerhalb, $F_{\text{außen}}$, bestimmt. Das Verhältnis $F_{\text{innen}}/F_{\text{außen}}$ wurde als Maß für die Membranpermeabilisierung verwendet. Das Verhältnis wurde für alle GUVs jeweils 5, 10 und 15 Minuten nach Zugabe von Nisin bestimmt. Diese Verhältnisse wurden dann für jede untersuchte Membranzusammensetzung als Histogramm aufgetragen, wobei für jedes Histogramm mindestens 30 GUVs analysiert wurden. Zur vereinfachten Darstellung wurden für jede untersuchte Membranzusammensetzung die mittleren Intensitätsverhältnisse $\langle F_{\text{innen}}/F_{\text{außen}} \rangle$ für die ausgewählten Zeitpunkte berechnet. Die Signifikanz der Daten wurde mit einem unabhängigen, zweiseitigen t -Test geprüft. p -Werte wurden mittels MATLAB bestimmt. Signifikante Werte wurden in den Diagrammen mit Sternchen gekennzeichnet (** für $p < 0,005$, * für $p < 0,01$ und * für $p < 0,1$).

5.9.2 Aggregatintensitätsanalyse

Die Intensitätsanalyse der Nisin-AF647-Aggregate in den GUV-Membranen wurde mit den Programmen ImageJ und MATLAB durchgeführt. Zuerst wurden die Bilder in Polarkoordinaten transformiert (Polartransformationsplugin von Edwin Donnelly, Vanderbilt Universität und Frederic Mothe, INRA Zentrum Nancy), wodurch die in der äquatorialen Ebene der GUVs gemessenen Ringprofile der Membran in Linearprofile konvertiert wurden. Die Intensität von Nisin-AF647 an der Membran wurde entlang einer 7 Pixel breiten Linie bestimmt. Die Intensitätswerte F wurden als Histogramm dargestellt, an welches eine Gaußfunktion angepasst wurde. Die aus der Anpassung erhaltenen Werte für den Erwartungswert \bar{F} und die Standardabweichung σ wurden verwendet, um die Profile gemäß $F_{\text{norm}} = \frac{F - \bar{F}}{\sigma}$ zu normieren. Als nächstes wurden molekulare Aggregate identifiziert, indem Peaks mit einer Intensität $F_{\text{norm}} > 3$ bestimmt wurden. Da die Peakintensität abhängig von der Zahl der fluoreszenten Moleküle ist, kann sie als Maß der Aggregatgröße verwendet werden. Aus der Anzahl der identifizierten Peaks entlang der GUV-Membran wurde eine Aggregatdichte pro Membranlänge bestimmt. Für jedes GUV wurden sowohl die Peakdichte

je Membranlänge als auch die mittlere Peakintensität bestimmt. Normalisierung, Peakidentifizierung und Aggregatanalyse wurden mittels einer dafür entwickelten, automatisierten MATLAB-Routine durchgeführt. Für jede experimentelle Bedingung wurden mindestens 20 äquatoriale Membranprofile ausgewertet. Für die verschiedenen experimentellen Bedingungen wurden die Mittelwerte aller Peakintensitäten sowie aller mittleren Peakdichten berechnet. Die Signifikanz der Daten wurde mit einem unabhängigen, zweiseitigen t -Test geprüft. p -Werte wurden mittels MATLAB bestimmt. Signifikante Werte wurden in den Diagrammen mit Sternchen gekennzeichnet (** für $p < 0,005$, * für $p < 0,01$ und * für $p < 0,1$).

5.9.3 Kolokalisationsanalyse

Die Analyse von zweifarbigen Bildern zum Nachweis der Kolokalisation von Nisin-AF647 und Lipid II-Atto488 in Aggregaten wurde mit ImageJ unter Verwendung des „*colocalization highlighter*“ Moduls (Christophe Laumonnier, Jerome Mutterer, Institute de Biologie Moleculaire des Plantes, Strasbourg) durchgeführt. Der Schwellenwert wurde auf einen Wert $\mu + 3\sigma$ gesetzt, mit dem Mittelwert μ und der Standardabweichung σ des Hintergrundsignals im entsprechenden Kanal. Pixel mit denselben Koordinaten wurden als kolokalisiert betrachtet, wenn für beide Bilder ihre Intensitätswerte über dem jeweiligen Schwellenwert lagen. Die Bilder der beiden Detektionskanäle wurden übereinandergelegt und kolokalisierte Pixel in weiß hervorgehoben.

5.9.4 Trajektorienanalyse

Die Einzelmolekülsignale wurden mittels des kommerziellen Bildbearbeitungsprogramms Diatrack (Semasopt) identifiziert und zu Trajektorien verbunden (Abbildung 5.6). Trajektorien sind Bewegungspfade von Molekülen, die durch eine Zeitsequenz von (x,y)-Koordinaten definiert sind. Die Identifizierung der Partikel erfolgte über die Bestimmung lokaler Intensitätsmaxima über einem Schwellenwert. Über die Funktion „*trash dim*“ konnten entsprechende Schwellenwerte ausgewählt werden. Günstige Werte lagen im Bereich von 25-35. Das Zentrum der Partikel wurde durch Anpassen einer 2-dimensionalen Gaußkurve an das Signal mit einer Sub-Pixel Präzision bestimmt [183]. Um die Nanolokalisierung der Molekülsignale automatisch durchzuführen, wurde der „*high precision mode*“ aktiviert. Zur Verknüpfung der Molekülpositionen zu Trajektorien wurde die Funktion „*Track!*“ gestartet. Die maximal zulässige Distanz r_{max} , die ein Molekül zwischen zwei Aufnahmen zurücklegen konnte, wurde mittels $r_{max} = 2,6\sqrt{4D\Delta t}$ mit dem Diffusionskoeffizienten D und der inversen Bildrate Δt abgeschätzt. Für die Lipidmobilität wurde ein Wert von $D = 5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ angenommen [46]. Der Faktor 2,6 entspricht einem Vertrauensintervall, in dem 99 % aller Sprünge bei gegebenem D und Δt liegen. Vor der weiteren Analyse wurden die Trajektorien

sortiert und in 5-minütige Zeitintervalle gruppiert. Es wurden nur Trajektorien bestehend aus mehr als drei Positionen ausgewertet. Jede weitere Datenanalyse wurde entweder mit Origin (OriginLab Corp.) oder MATLAB (MathWorks) ausgeführt.

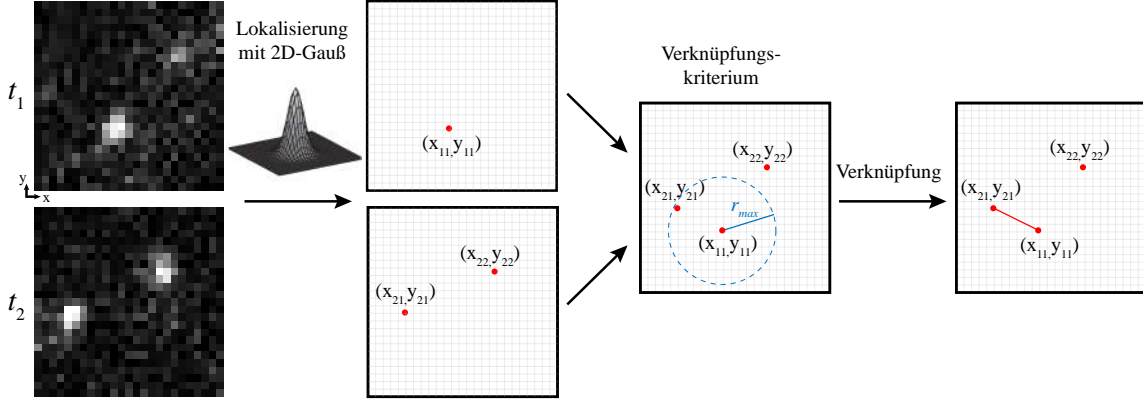


Abbildung 5.6: Nanolokalisierung der Einzelmolekülsignale mittels Anpassung einer 2-dimensionalen Gaußfunktion. Mittels des Kriteriums für die maximal zulässige Distanz r_{max} (blauer Kreis), die ein Molekül zwischen zwei Aufnahmen zurücklegen konnte, wurden die Positionen zu Trajektorien verknüpft (rote Linie).

Lokalisierungsgenauigkeit

Mortensen und Mitarbeiter ([184]) gaben folgende Formel an, um die eindimensionale, laterale Lokalisierungsgenauigkeit σ_x zu berechnen:

$$\sigma_x^2 = F \left(\frac{16(w^2 + a^2/12)}{9N} + \frac{8\pi b^2(w^2 + a^2/12)^2}{a^2 N^2} \right) \quad (5.1)$$

mit dem Faktor $F = 2$ für EMCCD (electron-multiplying charge-coupled device)-Kameras, der Halbwertsbreite der Punktspreizfunktion (point spread function, PSF) w , der Pixelbreite a , der Anzahl der Photonen des Signals N_{Phot} und dem Hintergrundrauschen b . Es sollte außerdem eine zusätzliche Verbreiterung des Signals durch die Bewegung des Emitters während der Aufnahmedauer berücksichtigt werden. Die daraus resultierende effektive Breite der PSF w_{eff} lässt sich nach Deschout und Mitarbeitern folgendermaßen berechnen ([185]):

$$w_{eff}^2 = w_0^2 + \frac{1}{3} D \Delta t \quad (5.2)$$

mit dem Diffusionskoeffizient D und der inversen Bildrate Δt . Die theoretische Halbwertsbreite der PSF w_0 lässt sich mittels $w_0 = \frac{0,51\lambda}{NA}$ bestimmen, wobei λ die Emissionswellenlänge des verwendeten Atto647-Farbstoffes (Tabelle) und NA die numerische Apertur des verwendeten Objektivs (Abschnitt 5.8.3) waren. Mittels

$$N_{Phot} = F \cdot B / (G \cdot QA) \quad (5.3)$$

lässt sich die Signalintensität F in die Anzahl der Photonen N_{Phot} umrechnen. Dabei sind B der Faktor, der die Umwandlung der Elektronenanzahl in digitale Einheiten charakterisiert, G der Faktor, mit dem das elektronische Signal beim Auslesen verstärkt wird, und QA die Quantenausbeute. Die Werte für B und QA wurden aus den Datenblättern des Kameraherstellers entnommen und betrugen $B = 18$ und $QA = 0,92$.

Analyse der mittleren Verschiebungsquadrate

Die bekannteste Methode zur Analyse von Partikeltrajektorien ist die Analyse der mittleren Verschiebungsquadrate (mean square displacement, MSD) $\langle r^2(n\Delta t) \rangle$. Dabei bezeichnet der Index $n = 1, \dots, N$ alle Positionen der einzelnen Trajektorien mit einer Länge N . Bei einer Auftragung von $\langle r^2(n\Delta t) \rangle$ gegen $n\Delta t$ mit der inversen Bildrate Δt zeigen die Kurven für unterschiedliche Bewegungsmodi einen charakteristischen Verlauf (Abbildung 5.7 A, [6]).

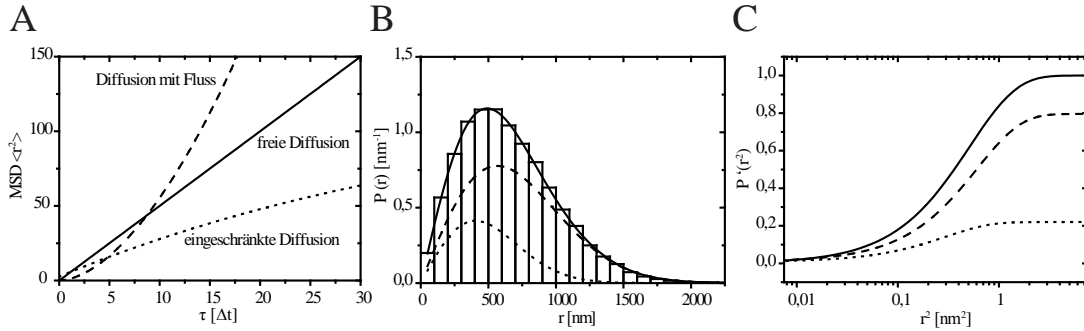


Abbildung 5.7: Trajektorienanalyse zur Berechnung von Diffusionskoeffizienten. (A) MSD-Kurven für Diffusion mit Fluss (gestrichelte Linie), freie Diffusion (durchgezogene Linie) und eingeschränkte Diffusion (gepunktete Linie). (B) Bimodale Sprungweitenverteilung mit den Komponenten $D_1 = 5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (gestrichelte Linie) und $D_2 = 2,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (gepunktete Linie). (C) Kumulative Verteilung der Verschiebungsquadrate r^2 mit denselben Parametern wie in (B).

Bei einer freien Diffusion der Partikel wird ein linearer Verlauf von $\langle r^2(n\Delta t) \rangle$ erhalten, der mit

$$\langle r^2(n\Delta t) \rangle = 4D_{mean}n\Delta t \quad (5.4)$$

für die 2-dimensionale Bewegung beschrieben werden kann [186]. Der Proportionalitätsfaktor ist das Vierfache des Diffusionskoeffizienten D . Anhand des Diffusionskoeffizienten lässt sich die Mobilität der Partikel charakterisieren. Es wurde für jedes Zeitintervall eine MSD-Kurve erstellt und der mittlere Diffusionskoeffizient D_{mean} durch Anpassung von Gleichung 5.4 aus der Steigung erhalten. Als Fehler wurde der Standardfehler angegeben, der bei der

Anpassung mittels eines Algorithmus des Software-Programms Origin zur Minimierung der Fehlerquadrate erhalten wurde.

Analyse der Diffusionskoeffizienten einzelner Trajektorien

Zur Berechnung einer Verteilung von Diffusionskoeffizienten wurde die MSD-Kurve jeder einzelnen Trajektorie analysiert und der entsprechende Diffusionskoeffizient $D_{mean,einzel}$ ermittelt. Es wurden nur Trajektorien mit mehr als drei detektierten Positionen ausgewertet. Die Werte für $D_{mean,einzel}$ wurden aus der linearen Anpassung der ersten drei Datenpunkte der MSD-Kurven erhalten. Die Anpassungsergebnisse der kurzen Trajektorien, die nur 3-5 MSD-Datenpunkte lieferten, waren durch niedrige Werte der Anpassungsgüte χ^2 gekennzeichnet. Deshalb war in der für die Analyse entwickelte MATLAB-Routine ein Filter für die Trajektorienlänge und die Güte der MSD-Anpassung enthalten. Die erhaltenen Diffusionskoeffizienten wurden als kumulative Verteilung aufgetragen. Die kumulativen Verteilungen wurden konstruiert, indem die Zahl der Werte $\leq D_{mean,einzel}$ bestimmt und auf die Gesamtzahl der Datenpunkte normiert wurde [187].

Analyse der Sprungweiten

Eine weitere Analyse der Molekülmobilität ist die Sprungweitenanalyse. Die Wahrscheinlichkeit, ein Molekül mit dem Diffusionskoeffizienten D nach einer Zeit Δt in einem Abstand $r + dr$ zum Ursprung zu finden, lässt sich mit folgender Gleichung beschreiben:

$$P(r, \Delta t)dr = \frac{1}{4\pi D\Delta t} \cdot e^{-\frac{r^2}{4D\Delta t}} \cdot 2\pi r dr. \quad (5.5)$$

Die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion lautet entsprechend:

$$P(r, \Delta t) = \frac{1}{4\pi D\Delta t} \cdot e^{-\frac{r^2}{4D\Delta t}} \cdot 2\pi r. \quad (5.6)$$

Zur Bestimmung von D wurde zunächst ein Histogramm der Sprungweiten erstellt. Dafür wurden die Distanzen zwischen den Trajektorienpositionen für ein festes Zeitintervall $n\Delta t$ vermessen. In dieser Arbeit wurden die Sprungdistanzen für das Zeitintervall $3\Delta t$ bestimmt, um sehr kurze Trajektorien, die durch kurzes Binden von freiem Atto647-Farbstoff verursacht wurden, herauszufiltern. Nur bei freier Diffusion der Probenmoleküle und bei ausreichender Statistik lassen sich die Histogramme mit Gleichung 5.6 gut beschreiben. Deshalb wurden für jedes Histogramm mindestens 15.000 Sprungweiten berücksichtigt. Aus den absoluten Häufigkeiten wurden relative Häufigkeitsdichten bestimmt, indem jede Klasse des Histogramms durch die Klassenbreite in μm und die Gesamtzahl der Sprünge geteilt wurde. Die Anpassung mittels Origin von Gleichung 5.6 an das normierte Histogramm lieferte

den Diffusionskoeffizienten D . Als Fehler wurde der Standardfehler angegeben, der bei der Anpassung mittels eines Algorithmus des Software-Programms Origin zur Minimierung der Fehlerquadrate erhalten wurde.

Um mehrere Mobilitätsfraktionen zu berücksichtigen (Abbildung 5.7 B), kann Gleichung 5.6 erweitert werden (z. B. [46]) zu

$$P(r, \Delta t) = \sum_{i=1}^m \frac{A_i}{4\pi D_i \Delta t} \cdot e^{-\frac{r^2}{4D_i \Delta t}} \cdot 2\pi r \quad (5.7)$$

mit dem relativen Anteil A_i ($\sum_{i=1}^m A_i = 1$) [187] des Diffusionskoeffizienten. Dabei ist Gleichung 5.7 die Summe der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen einzelner Diffusionsspezies, die mit der Häufigkeit ihres Vorkommens in der Gesamtpopulation gewichtet werden. Die Anzahl der relativen Mobilitätsanteile m ist kein Anpassungsparameter, sondern muss vor der Anpassung festgesetzt werden. In dieser Arbeit wurde die zur guten Beschreibung der Daten notwendige Zahl der Fraktionen i durch Vergleich der Anpassungsgüten χ^2 für Anpassungen mit $m = 1, \dots, 5$ bestimmt.

Um den Informationsverlust und eventuell falsche Gewichtungen durch das Zusammenfassen von Sprungweiten beim Erstellen des Histogramms zu verhindern, können analog die kumulativen Verteilungen der quadratischen Sprungweiten (oder Verschiebungsquadrate) r^2 mit der folgenden Funktion angepasst werden (Abbildung 5.7 C, [186]):

$$P'(r, \Delta t) = 1 - \sum_{i=1}^k A_i \cdot e^{-\frac{r^2}{4D_i \Delta t}}. \quad (5.8)$$

Als Fehler wurde wiederum der Standardfehler angegeben, der bei der Anpassung mittels eines Algorithmus des Software-Programms Origin zur Minimierung der Fehlerquadrate erhalten wurde. Die kumulativen Verteilungen wurden konstruiert, indem die Zahl der Werte $\leq r^2$ bestimmt und auf die Gesamtzahl der Datenpunkte normiert wurde [187].

5.9.5 Radiusberechnung von membranintegrierten Partikeln

Zur Berechnung der Partikelradien von Lipiden und Membranviskositäten aus Diffusionskoeffizienten wurde die von Saffman und Delbrück [62] entwickelte Gleichung 1.2 auf Grundlage des hydrodynamischen Modells verwendet. Das Saffman-Delbrück Modell ist jedoch nur für kleine Membraneinschlüsse gültig. Ein generelles Modell wurde von Hughes und Mitarbeitern [63] entwickelt, erfordert aber komplizierte, numerische Rechnungen. Als sehr gute Näherung dafür wurde von Petrov und Schwille ein analytischer Ausdruck berechnet

(Gleichung 1.3, [67]). Diese Gleichung wurde verwendet, um aus den Diffusionskoeffizienten für Lipid II-Atto647-Mobilitäten nach Zugabe von Nisin Aggregatradien zu berechnen.

5.9.6 Bestimmung der Vesikelgröße

Die Radien der Riesenvesikel wurden bestimmt, indem Projektionen der volumetrischen Aufnahmen (Abschnitt 5.8.3) mittels ImageJ erstellt wurden (Abbildung 5.8). Dadurch war der Umriss der Vesikel zu erkennen und konnte manuell vermessen werden. Um die Größe der Riesenvesikel als Funktion der Zeit zu erhalten, wurden die Radien 7,5, 12,5, 17,5 und 22,5 Minuten nach Zugabe von Nisin bestimmt.

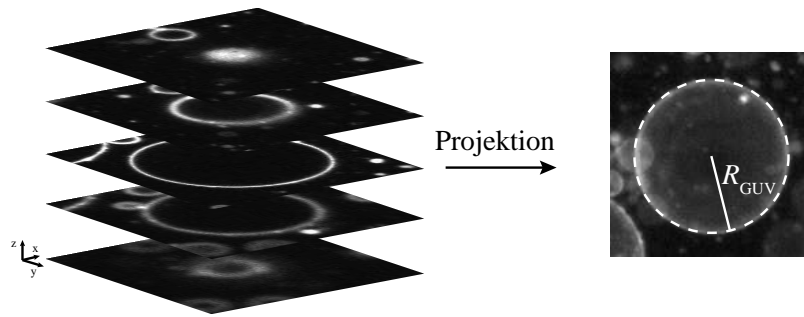


Abbildung 5.8: Zunächst wurden Schnitte durch die GUVs im Abstand von 1 μm aufgenommen, indem die Probe in z-Richtung durch das Lichtblatt gefahren wurde. Dann wurde eine Projektion aller Ebenen erstellt und der Radius der GUVs R_{GUV} manuell mit ImageJ vermessen.

5.9.7 Intensitätsanalyse in Bakterien

Für die Analyse der Korrelation zwischen Zellpermeation und Nisinaggregation wurden die maximalen Pixelintensitäten für SYTOX Green und Nisin-AF647 je Bakterienzelle bestimmt. Dafür wurde mittels ImageJ alle Pixelwerte der einzelnen Zellen ermittelt und der Maximalwert bestimmt (Abbildung 5.9). Anschließend wurden die Maximalwerte für SYTOX Green gegen die entsprechenden Maximalwerte für Nisin-AF647 aufgetragen. Es wurden 80 Zellen aus 3 Experimenten ausgewertet.

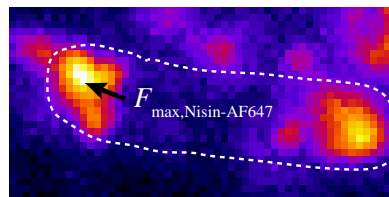


Abbildung 5.9: Nisin-AF647-Fluoreszenzsignal an einer Zelle von *Bacillus subtilis* (gestrichelte Linie). Es wurde der maximale Pixelwert in dieser Region bestimmt. Für die SYTOX Green-Signale wurde genauso verfahren.

6 Material

6.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 6.1: Liste der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

Farbstoff	Funktionalisierung	Firma	λ_{ex} [nm]	λ_{ex} [nm]
Alexa Fluor 546	NHS-Ester	Invitrogen	554	570
Alexa Fluor 647	NHS-Ester	Invitrogen	651	672
Alexa Fluor 647	Hydrazid	Invitrogen	649	666
Atto 488	NHS-Ester	ATTO-TEC	501	523
Atto 647	NHS-Ester	ATTO-TEC	645	669
Carboxyfluorescein		Sigma-Aldrich	492	517
Lucifer Yellow		Invitrogen	428	536
SYTOX Green		Invitrogen	504	523

6.2 Peptide

Natives Nisin Z wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Sahl, Pharmazeutische Mikrobiologie, Universität Bonn, zu Verfügung gestellt.

6.3 Lipide

Lipid I und Lipid II wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Sahl, Pharmazeutische Mikrobiologie, Universität Bonn, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 6.2: Liste der verwendeten Lipide.

Lipid	Abkürzung	Firma
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	DOPC	Avanti Polar Lipids
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol	DOPG	Avanti Polar Lipids
1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	POPC	Avanti Polar Lipids
1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin	POPE	Avanti Polar Lipids
Undecaprenyldiphosphat	C ₅₅ -PP	Larodan Fine Chemicals
Undecaprenylphosphat	C ₅₅ -P	Larodan Fine Chemicals

6.4 Chemikalien

Tabelle 6.3: Liste der Lösungsmittel.

Lösungsmittel	Firma
Acetonitril	J. T. Baker
Ammoniak	J. T. Baker
Butanol	J. T. Baker
Chloroform	J. T. Baker
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin	J. T. Baker
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich
Methanol	Sigma Aldrich
Pyridin	J. T. Baker
Triethylamin	Carl Roth
Trifluoressigsäure	J. T. Baker

Tabelle 6.4: Liste der Reagenzien.

Reagenzien	Abkürzung	Firma
Agarose Low Melt		AppliChem
Ammoniumchlorid		Carl Roth
Bovines Serumalbumin	BSA	Sigma Aldrich
Calciumchlorid		Carl Roth
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	EDC	Thermo Scientific
Glucose		Sigma Aldrich
Hefeextrakt		Carl Roth
Hellmanex II		Hellma
Kaliumhydrogenphosphat		Carl Roth
Magnesiumsulfat		Carl Roth
2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure	MES	Carl Roth
Natriumchlorid		Carl Roth
Natriumhydrogenphosphat		Carl Roth
Natriumsulfat		Carl Roth
Ninhydrin-Sprühlösung für die DC		Carl Roth
Saccharose		Sigma Aldrich
Trypton/Pepton aus Casein		Carl Roth

6.5 Bakterienstämme

Tabelle 6.5: Liste der verwendeten Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Verwendung
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Mikroskopie
<i>Lactococcus lactis</i> NIZO22186	Nisinproduktion
<i>Micrococcus luteus</i>	Präparation von Membranen mit enzymatischer Aktivität
<i>Staphylococcus simulans</i> 22	Produktion von UDP-MurNAc-Pentapeptid

Die Bakterienstämme wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Sahl, Pharmazeutische Mikrobiologie, Universität Bonn, zur Verfügung gestellt.

6.6 Medien

LB (Lysogeny broth)-Medium

10 g Trypton/Pepton, 5 g Hefeextrakt und 10 g Natriumchlorid wurden in 1 L deionisiertem Wasser gelöst, der pH-Wert wurde auf pH = 7 eingestellt und das Medium autoklaviert.

M9-Minimalmedium

Zunächst wurde eine konzentrierte Salzlösung aus 64 g Natriumhydrogenphosphat, 15 g Kaliumhydrogenphosphat, 2,5 g Natriumchlorid und 5 g Ammoniumchlorid in 1 L deionisiertem Wasser hergestellt und sterilfiltriert. Zur Herstellung von 100 mL des M9-Minimalmediums, wurden 20 mL der Salzlösung, 200 µL einer 1 M Magnesiumsulfatlösung, 10 µL einer 1 M Calciumchloridlösung, 2 mL einer 20 %igen Glucoselösung (w/v) und 78 mL deionisiertes Wasser zusammengegeben. Vor der Verwendung wurde das Minimalmedium sterilfiltriert.

6.7 Sonstige Materialien

Tabelle 6.6: Liste der Zubehöerteile zur Elektroformation.

Zubehörteil	Spezifikation	Firma
Deckglas beschichtet mit Indiumzinnoxid	25 mm x 25 mm x 1,1 mm, Oberflächenwiderstand 8-12 Ω /sq	Sigma Aldrich
1-Kanal-Funktionsgenerator	FG 250 D	VOLTCRAFT
Kupferfolie	6,4 mm, selbstklebend	Edco Supply Corporation
O-Ring	Viton umhüllt mit FEP, 12 mm x 2 mm	Kudernak Industriedichtungen
Silikon-Hochvakuumfett	schwer	Lomisol GmbH

Tabelle 6.7: Liste des Zubehörs zur Vesikelpräparation.

Zubehör	Spezifikation	Firma
Glassäule	Länge 20 cm, innerer Durchmesser 1 cm	Bio-Rad
Mini-Extruder		Avanti Polar Lipids
Polycarbonatmembranen	19 mm, Porengröße 0,1 µm	GE Healthcare
Säulenmaterial	G-50 medium	GE Healthcare
Spritze	250 µL, luftdicht	Hamilton

Tabelle 6.8: Liste der Probenkammern.

Kammer	Verwendung	Firma
Mikroskopierschale mit Deckglasboden, 50 mm, unbeschichtet	Konfokale Laserrastermikroskopie, Interne Totalreflexionsmikroskopie	MatTek Corporation
Mikrotiterplatte, 96 Vertiefungen	Aktivitätsuntersuchung von Nisin	TPP Techno Plastic Products AG
Probenküvette 105-044-V2-40	Lichtblattmikroskopie	Hellma
Probenküvette 104002F-10-40	Fluoreszenzspektroskopie	Hellma
Zellkulturkammer mit Deckglasboden, 8 Vertiefungen	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	Sarstedt

Literaturverzeichnis

- [1] J. E. Johnson and R. B. Cornell. Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions (review). Mol Membr Biol, 16(3):217–235, 1999.
 - [2] S. R. Neves, P. T. Ram, and R. Iyengar. G protein pathways. Science, 296(5573):1636–1639, May 2002.
 - [3] S. Mayor and H. Riezman. Sorting GPI-anchored proteins. Nat Rev Mol Cell Biol, 5(2):110–120, Feb 2004.
 - [4] S. J. Singer and G. L. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, 175(4023):720–731, Feb 1972.
 - [5] E. J. M. Helmreich. Environmental influences on signal transduction through membranes: a retrospective mini-review. Biophys Chem, 100(1-3):519–534, 2003.
 - [6] M. J. Saxton and K. Jacobson. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 26:373–399, 1997.
 - [7] A. Kusumi, C. Nakada, K. Ritchie, K. Murase, K. Suzuki, H. Murakoshi, R. S. Kasai, J. Kondo, and T. Fujiwara. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 34:351–378, 2005.
 - [8] V. Wells Rowlett and W. Margolin. The bacterial Min system. Curr Biol, 23(13):R553–R556, Jul 2013.
 - [9] W. Dowhan, E. Mileykovskaya, and M. Bogdanov. Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches. Biochim Biophys Acta, 1666(1-2):19–39, Nov 2004.
 - [10] D. A. Brown and E. London. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. J Biol Chem, 275(23):17221–17224, Jun 2000.
 - [11] D. Lingwood and K. Simons. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. Science, 327(5961):46–50, Jan 2010.
 - [12] L. J. Pike. Rafts defined: a report on the keystone symposium on lipid rafts and cell function. J Lipid Res, 47(7):1597–1598, Jul 2006.
 - [13] D. López and R. Kolter. Functional microdomains in bacterial membranes. Genes Dev, 24(17):1893–1902, Sep 2010.
 - [14] G. van Meer, D. R. Voelker, and G. W. Feigenson. Membrane lipids: where they are and how they behave. Nat Rev Mol Cell Biol, 9(2):112–124, Feb 2008.
 - [15] E. A. Evans and R. Waugh. Mechano-chemistry of closed, vesicular membrane systems. J Colloid Interface Sci, 60(2):286–298, 1977.
 - [16] J. Henriksen, A. C. Rowat, E. Brief, Y. W. Hsueh, J. L. Thewalt, M. J. Zuckermann, and J. H. Ipsen. Universal behavior of membranes with sterols. Biophys J, 90(5):1639–1649, 2006.
 - [17] C. Sohlenkamp, I. M. López-Lara, and O. Geiger. Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. Prog Lipid Res, 42(2):115–162, Mar 2003.
 - [18] Y.-M. Zhang and C. O. Rock. Membrane lipid homeostasis in bacteria. Nat Rev Microbiol, 6(3):222–233, Mar 2008.
 - [19] S. Morein, A.-S. Andersson, L. Rilfors, and G. Lindblom. Wild-type escherichia coli cells regulate
-

- the membrane lipid composition in a window between gel and non-lamellar structures. J Biol Chem, 271(12):6801–6809, 1996.
- [20] J. A. Den Kamp, I. Redai, and L.L. Van Deenen. Phospholipid composition of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 99(1):298–303, 1969.
- [21] P. R. Beining, E. Huff, B. Prescott, and T. S. Theodore. Characterization of the lipids of mesosomal vesicles and plasma membranes from *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 121(1):137–143, Jan 1975.
- [22] T. J. Silhavy, D. Kahne, and S. Walker. The bacterial cell envelope. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2(5):a000414, May 2010.
- [23] S. Brown, J. P Santa Maria Jr., and S. Walker. Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. Annu Rev Microbiol, 67:313–336, 2013.
- [24] M. G. Percy and A. Gründling. Lipoteichoic acid synthesis and function in Gram-positive bacteria. Annu Rev Microbiol, May 2014.
- [25] T. Mohammadi, V. van Dam, R. Sijbrandi, T. Vernet, A. Zapun, A. Bouhss, M. Diepeveen-de Bruin, M. Nguyen-Disteche, B. de Kruijff, and E. Breukink. Identification of ftsw as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. EMBO J, 30(8):1425–1432, Apr 2011.
- [26] T. Schneider and H.-G. Sahl. An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. Int J Med Microbiol, 300(2-3):161–169, Feb 2010.
- [27] J. B. de la Serna, J. Perez-Gil, A. C. Simonsen, and L. A. Bagatolli. Cholesterol rules: direct observation of the coexistence of two fluid phases in native pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures. J Biol Chem, 279(39):40715–40722, Sep 2004.
- [28] F. Roder, S. Waichman, D. Paterok, R. Schubert, C. Richter, B. Liedberg, and J. Piehler. Reconstitution of membrane proteins into polymer-supported membranes for probing diffusion and interactions by single molecule techniques. Anal Chem, 83(17):6792–6799, 2011.
- [29] M. I. Angelova and D. S. Dimitrov. Liposome electroformation. Faraday Discuss Chem Soc, 81:303–311, 1986.
- [30] E. Sackmann. Supported membranes: scientific and practical applications. Science, 271(5245):43–48, 1996.
- [31] M. L. Wagner and L. K. Tamm. Tethered polymer-supported planar lipid bilayers for reconstitution of integral membrane proteins: silane-polyethyleneglycol-lipid as a cushion and covalent linker. Biophys J, 79(3):1400–1414, 2000.
- [32] P. Ram and J. H. Prestegard. Magnetic field induced ordering of bile salt/phospholipid micelles: new media for NMR structural investigations. Biochim Biophys Acta, 940(2):289–294, 1988.
- [33] P. Schwill. Bottom-up synthetic biology: engineering in a tinkerer’s world. Science, 333(6047):1252–1254, 2011.
- [34] J. P. Reeves and R. M. Dowben. Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. J Cell Physiol, 73(1):49–60, Feb 1969.
- [35] L. A. Bagatolli, T. Parasassi, and E. Gratton. Giant phospholipid vesicles: comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods: a two photon fluorescence microscopy study. Chem Phys Lipids, 105(2):135–147, Apr 2000.
- [36] T. Shimanouchi, H. Umakoshi, and R. Kuboi. Kinetic study on giant vesicle formation with electroformation method. Langmuir, 25(9):4835–4840, May 2009.
- [37] L.-R. Montes, A. Alonso, F. M. Goñi, and L. A. Bagatolli. Giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions. Biophys J, 93(10):3548–3554, Nov 2007.
-

-
- [38] C. Ciobanasu. Mobility and Translocation of TAT Peptides in Model Membranes. PhD thesis, Universitäts- und Landesbibliothek Bonn, 2010.
- [39] K. Tsumoto, H. Matsuo, M. Tomita, and T. Yoshimura. Efficient formation of giant liposomes through the gentle hydration of phosphatidylcholine films doped with sugar. Colloids Surf B Biointerfaces, 68(1):98–105, Jan 2009.
- [40] M. Dezi, A. Di Cicco, P. Bassereau, and D. Lévy. Detergent-mediated incorporation of transmembrane proteins in giant unilamellar vesicles with controlled physiological contents. Proc Natl Acad Sci U S A, 110(18):7276–7281, Apr 2013.
- [41] T. Baumgart, A. T. Hammond, P. Sengupta, S. T. Hess, D. A. Holowka, B. A. Baird, and W. W. Webb. Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(9):3165–3170, Feb 2007.
- [42] E. Evans, W. Rawicz, and B. A. Smith. Concluding remarks back to the future: mechanics and thermodynamics of lipid biomembranes. Faraday discussions, 161:591–611, 2013.
- [43] S. L. Veatch and S. L. Keller. Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. Biophys J, 85(5):3074–3083, Nov 2003.
- [44] L. A. Bagatolli and D. Needham. Quantitative optical microscopy and micromanipulation studies on the lipid bilayer membranes of giant unilamellar vesicles. Chem Phys Lipids, 181:99–120, Jul 2014.
- [45] J. Korlach, P. Schwille, W. W. Webb, and G. W. Feigenson. Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(15):8461–8466, 1999.
- [46] C. Ciobanasu, E. Harms, G. Tünnemann, M. C. Cardoso, and U. Kubitscheck. Cell-penetrating HIV1 TAT peptides float on model lipid bilayers. Biochemistry, 48(22):4728–4737, 2009.
- [47] E. Mabrouk, D. Cuvelier, L.-L. Pontani, B. Xu, D. Lévy, P. Keller, F. Brochard-Wyart, P. Nassoy, and M.-H. Li. Formation and material properties of giant liquid crystal polymersomes. Soft Matter, 5(9):1870–1878, 2009.
- [48] J. M. Alam, T. Kobayashi, and M. Yamazaki. The single-giant unilamellar vesicle method reveals lysenin-induced pore formation in lipid membranes containing sphingomyelin. Biochemistry, 51(25):5160–5172, Jun 2012.
- [49] H.-Y. Chang, Y.-J. Sheng, and H.-K. Tsao. Structural and mechanical characteristics of polymersomes. Soft Matter, 10(34):6373–6381, 2014.
- [50] S. Li, P. Hu, and N. Malmstadt. Confocal imaging to quantify passive transport across biomimetic lipid membranes. Anal Chem, 82(18):7766–7771, 2010.
- [51] C. Ciobanasu, J.-P. Siebrasse, and U. Kubitscheck. Cell-penetrating HIV1 TAT peptides can generate pores in model membranes. Biophysical journal, 99(1):153–162, 2010.
- [52] K. Scherer, I. Wiedemann, C. Ciobanasu, H.-G. Sahl, and U. Kubitscheck. Aggregates of nisin with various bactoprenol-containing cell wall precursors differ in size and membrane permeation capacity. Biochim Biophys Acta, 1828(11):2628–2636, Nov 2013.
- [53] P. L. Yeagle. The structure of biological membranes. CRC press, 2010.
- [54] D. Axelrod. Lateral motion of membrane proteins and biological function. J Membr Biol, 75(1):1–10, 1983.
- [55] P. Ronchi, S. Colombo, M. Francolini, and N. Borgese. Transmembrane domain-dependent partitioning of membrane proteins within the endoplasmic reticulum. J Cell Biol, 181(1):105–118, Apr 2008.
- [56] M. H. Cohen and D. Turnbull. Molecular transport in liquids and glasses. J Chem Phys, 31(5):1164–
-

- 1169, 1959.
- [57] D. Turnbull and M. H. Cohen. Free-volume model of the amorphous phase: Glass transition. *J Chem Phys*, 34(1):120–125, 1961.
- [58] H. J. Galla, W. Hartmann, U. Theilen, and E. Sackmann. On two-dimensional passive random walk in lipid bilayers and fluid pathways in biomembranes. *J Membr Biol*, 48(3):215–236, Jul 1979.
- [59] J. E. MacCarthy and John J. Kozak. Lateral diffusion in fluid systems. *J Chem Phys*, 77(4):2214–2216, 1982.
- [60] W. L. Vaz, R. M. Clegg, and D. Hallmann. Translational diffusion of lipids in liquid crystalline phase phosphatidylcholine multibilayers. a comparison of experiment with theory. *Biochemistry*, 24(3):781–786, Jan 1985.
- [61] P. F. Almeida, W. L. Vaz, and T. E. Thompson. Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis. *Biochemistry*, 31(29):6739–6747, Jul 1992.
- [62] P. G. Saffman and M. Delbrück. Brownian motion in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(8):3111–3113, Aug 1975.
- [63] B. D. Hughes, B. A. Pailthorpe, and L. R. White. The translational and rotational drag on a cylinder moving in a membrane. *J Fluid Mech*, 110:349–372, 9 1981.
- [64] S. Ramadurai, A. Holt, V. Krasnikov, G. van den Bogaart, J. A. Killian, and B. Poolman. Lateral diffusion of membrane proteins. *J Am Chem Soc*, 131(35):12650–12656, Sep 2009.
- [65] P. Cicuta, S. L. Keller, and S. L. Veatch. Diffusion of liquid domains in lipid bilayer membranes. *J Phys Chem B*, 111(13):3328–3331, Apr 2007.
- [66] G. Guigas and M. Weiss. Size-dependent diffusion of membrane inclusions. *Biophys J*, 91(7):2393–2398, Oct 2006.
- [67] E. P. Petrov and P. Schuille. Translational diffusion in lipid membranes beyond the Saffman-Delbrück approximation. *Biophys J*, 94(5):L41–L43, Mar 2008.
- [68] F. Quemeneur, J. K. Sigurdsson, M. Renner, P. J. Atzberger, P. Bassereau, and D. Lacoste. Shape matters in protein mobility within membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(14):5083–5087, Apr 2014.
- [69] B. S. Glick and V. Malhotra. The curious status of the Golgi apparatus. *Cell*, 95(7):883–889, Dec 1998.
- [70] F. Valtorta, J. Meldolesi, and R. Fesce. Synaptic vesicles: is kissing a matter of competence? *Trends Cell Biol*, 11(8):324–328, Aug 2001.
- [71] R. S. Cantor. The influence of membrane lateral pressures on simple geometric models of protein conformational equilibria. *Chem Phys Lipids*, 101(1):45–56, Aug 1999.
- [72] R. Dimova, S. Aranda, N. Bezlyepkina, V. Nikolov, K. A. Riske, and R. Lipowsky. A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nanoregime via optical microscopy. *J Phys Condens Matter*, 18(28):S1151–S1176, Jul 2006.
- [73] J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, and B. W. Ninham. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J Chem Soc, Faraday Transactions 2*, 72:1525–1568, 1976.
- [74] A. Tonnesen, S. M. Christensen, V. Tkach, and D. Stamou. Geometrical membrane curvature as an allosteric regulator of membrane protein structure and function. *Biophys J*, 106(1):201–209, Jan 2014.
- [75] V. Nikolov, R. Lipowsky, and R. Dimova. Behavior of giant vesicles with anchored DNA molecules. *Biophys J*, 92(12):4356–4368, 2007.
- [76] Y. Yu, J. A. Vroman, S. C. Bae, and S. Granick. Vesicle budding induced by a pore-forming peptide.
-

- J Am Chem Soc, 132(1):195–201, 2009.
- [77] F.-C. Tsai and H.-Y. Chen. Adsorption-induced vesicle fission. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 78(5 Pt 1):051906, Nov 2008.
- [78] G. Drin, J.-F. Casella, R. Gautier, T. Boehmer, T. U. Schwartz, and B. Antonny. A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. Nat Struct Mol Biol, 14(2):138–146, Feb 2007.
- [79] J. C. Stachowiak, C. C. Hayden, and D. Y. Sasaki. Steric confinement of proteins on lipid membranes can drive curvature and tubulation. Proc Natl Acad Sci U S A, 107(17):7781–7786, 2010.
- [80] P. Schiller. Molecular statistical model for adsorbed membrane particles. Molecular Physics, 98(8):493–503, 2000.
- [81] B. J. Reynwar, G. Illya, V. A. Harmandaris, M. M. Müller, K. Kremer, and M. Deserno. Aggregation and vesiculation of membrane proteins by curvature-mediated interactions. Nature, 447(7143):461–464, May 2007.
- [82] M. P. Sheetz and S. J. Singer. Biological membranes as bilayer couples. a molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. Proc Natl Acad Sci U S A, 71(11):4457–4461, Nov 1974.
- [83] J. Zimmerberg and M. M. Kozlov. How proteins produce cellular membrane curvature. Nat Rev Mol Cell Biol, 7(1):9–19, Jan 2006.
- [84] D. A. Phoenix, S. R. Dennison, and F. Harris. Antimicrobial peptides: their history, evolution, and functional promiscuity. Wiley Online Library, 2013.
- [85] K. Brown. The history of penicillin from discovery to the drive to production. Pharm Hist (Lond), 34(3):37–43, Sep 2004.
- [86] J.-P. Gratia. Andre Gratia: a forerunner in microbial and viral genetics. Genetics, 156(2):471–476, 2000.
- [87] H. L. Van Epps. René dubos: unearthing antibiotics. J Exp Med, 203(2):259, Feb 2006.
- [88] R. J. Dubos. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus : I. preparation of the agent. its activity in vitro. J Exp Med, 70(1):1–10, Jun 1939.
- [89] M. Zasloff. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature, 415(6870):389–395, Jan 2002.
- [90] A. Izadpanah and R. L. Gallo. Antimicrobial peptides. J Am Acad Dermatol, 52(3 Pt 1):381–90; quiz 391–2, Mar 2005.
- [91] M. Nishie, J.-I. Nagao, and K. Sonomoto. Antibacterial peptides “bacteriocins”: an overview of their diverse characteristics and applications. Biocontrol Sci, 17(1):1–16, Mar 2012.
- [92] A. Dobson, P. D. Cotter, R. P. Ross, and C. Hill. Bacteriocin production: a probiotic trait? Appl Environ Microbiol, 78(1):1–6, Jan 2012.
- [93] G. Wang, X. Li, and Z. Wang. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. Nucleic Acids Res, 37(Database issue):D933–D937, Jan 2009.
- [94] K. A. Brogden. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nat Rev Microbiol, 3(3):238–250, Mar 2005.
- [95] M.-D. Seo, H.-S. Won, J.-H. Kim, T. Mishig-Ochir, and B.-J. Lee. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review. Molecules, 17(10):12276–12286, 2012.
- [96] D. G. McCafferty, P. Cudic, M. K. Yu, D. C. Behenna, and R. Kruger. Synergy and duality in peptide antibiotic mechanisms. Curr Opin Chem Biol, 3(6):672–680, Dec 1999.
- [97] A. Romanelli, L. Moggio, R. C. Montella, P. Campiglia, M. Iannaccone, F. Capuano, C. Pedone, and R. Capparelli. Peptides from royal jelly: studies on the antimicrobial activity of jelleins, jelleins analogs and synergy with temporins. J Pept Sci, 17(5):348–352, May 2011.
-

- [98] H. Ulvatne, S. Karoliussen, T. Stiberg, O. Rekdal, and J. S. Svendsen. Short antibacterial peptides and erythromycin act synergically against *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother, 48(2):203–208, Aug 2001.
 - [99] X. Chen, F. Niyonsaba, H. Ushio, D. Okuda, I. Nagaoka, S. Ikeda, K. Okumura, and H. Ogawa. Synergistic effect of antibacterial agents human beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. J Dermatol Sci, 40(2):123–132, Nov 2005.
 - [100] E. Breukink, I. Wiedemann, C. van Kraaij, O. P. Kuipers, H. G. Sahl, and B. de Kruijff. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. Science, 286(5448):2361–2364, Dec 1999.
 - [101] Y. Shai. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. Biopolymers, 66(4):236–248, 2002.
 - [102] E. Breukink and B. de Kruijff. Lipid II as a target for antibiotics. Nat Rev Drug Discov, 5(4):321–332, Apr 2006.
 - [103] P. Demchick and A. L. Koch. The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 178(3):768–773, Feb 1996.
 - [104] J. van Heijenoort. Lipid intermediates in the biosynthesis of bacterial peptidoglycan. Microbiol Mol Biol Rev, 71(4):620–635, Dec 2007.
 - [105] K. Matsuzaki, O. Murase, and K. Miyajima. Kinetics of pore formation by an antimicrobial peptide, magainin 2, in phospholipid bilayers. Biochemistry, 34(39):12553–12559, Oct 1995.
 - [106] M. R. Yeaman and N. Y. Yount. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacol Rev, 55(1):27–55, Mar 2003.
 - [107] R. E. Hancock and D. S. Chapple. Peptide antibiotics. Antimicrob Agents Chemother, 43(6):1317–1323, Jun 1999.
 - [108] M. Vila-Perelló and D. Andreu. Characterization and structural role of disulfide bonds in a highly knotted thionin from *Pyricularia pubera*. Biopolymers, 80(5):697–707, 2005.
 - [109] P. M. Hwang and H. J. Vogel. Structure-function relationships of antimicrobial peptides. Biochem Cell Biol, 76(2-3):235–246, 1998.
 - [110] H. W. Huang. Action of antimicrobial peptides: two-state model. Biochemistry, 39(29):8347–8352, Jul 2000.
 - [111] F.-Y. Chen, M.-T. Lee, and H. W. Huang. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. Biophys J, 84(6):3751–3758, Jun 2003.
 - [112] D. Juretić, H. C. Chen, J. H. Brown, J. L. Morell, R. W. Hendler, and H. V. Westerhoff. Magainin 2 amide and analogues. Antimicrobial activity, membrane depolarization and susceptibility to proteolysis. FEBS Lett, 249(2):219–223, Jun 1989.
 - [113] R. M. Epanand and R. F. Epanand. Domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. Mol Biosyst, 5(6):580–587, Jun 2009.
 - [114] A. Zemel, A. Ben-Shaul, and S. May. Membrane perturbation induced by interfacially adsorbed peptides. Biophys J, 86(6):3607–3619, Jun 2004.
 - [115] L. T. Nguyen, E. F. Haney, and H. J. Vogel. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Trends Biotechnol, 29(9):464–472, Sep 2011.
 - [116] V. Teixeira, M. J. Feio, and M. Bastos. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. Prog Lipid Res, 51(2):149–177, Apr 2012.
 - [117] B. Bechinger and K. Lohner. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. Biochim Biophys Acta, 1758(9):1529–1539, Sep 2006.
-

-
- [118] G. Boheim. Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes. *J Membr Biol*, 19(3):277–303, 1974.
- [119] S. J. Ludtke, K. He, W. T. Heller, T. A. Harroun, L. Yang, and H. W. Huang. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry*, 35(43):13723–13728, Oct 1996.
- [120] W. C. Wimley. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chem Biol*, 5(10):905–917, Oct 2010.
- [121] D. L. Parton, E. V. Akhmatkaya, and M. S P. Sansom. Multiscale simulations of the antimicrobial peptide maculatin 1.1: water permeation through disordered aggregates. *J Phys Chem B*, 116(29):8485–8493, Jul 2012.
- [122] A. T. R. Mattick and A. Hirsch. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, 2(6462):5–8, Jul 1947.
- [123] M. K. Rayman, B. Aris, and A. Hurst. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Appl Environ Microbiol*, 41(2):375–380, Feb 1981.
- [124] N. Garg, T. J. Oman, T.-S. Andrew Wang, C. V. De Gonzalo, S. Walker, and W. A. van der Donk. Mode of action and structure-activity relationship studies of geobacillin I. *J Antibiot (Tokyo)*, 67(1):133–136, Jan 2014.
- [125] E. Gross and J. L. Morell. The structure of nisin. *J Am Chem Soc*, 93(18):4634–4635, Sep 1971.
- [126] R. Hammami, A. Zouhir, C. Le Lay, J. Ben Hamida, and I. Fliss. Bactibase second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. *BMC Microbiol*, 10:22, 2010.
- [127] J. W. Mulders, I. J. Boerrigter, H. S. Rollema, R. J. Siezen, and W. M. de Vos. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur J Biochem*, 201(3):581–584, Nov 1991.
- [128] H. Brötz and H.-G. Sahl. New insights into the mechanism of action of lantibiotics—diverse biological effects by binding to the same molecular target. *J Antimicrob Chemother*, 46(1):1–6, Jul 2000.
- [129] L. V. Thomas and J. W. Wimpenny. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*, 62(6):2006–2012, Jun 1996.
- [130] G. R. Grimsley, J. M. Scholtz, and C. N. Pace. A summary of the measured pK values of the ionizable groups in folded proteins. *Protein Sci*, 18(1):247–251, Jan 2009.
- [131] F. J. Van de Ven, H. W. Van den Hooven, R. N. Konings, and C. W. Hilbers. NMR studies of lantibiotics. The structure of nisin in aqueous solution. *Eur J Biochem*, 202(3):1181–1188, Dec 1991.
- [132] E. Ruhr and H. G. Sahl. Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles. *Antimicrob Agents Chemother*, 27(5):841–845, May 1985.
- [133] I. Wiedemann, E. Breukink, C. van Kraaij, O. P. Kuipers, G. Bierbaum, B. de Kruijff, and H.-G. Sahl. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Biol Chem*, 276(3):1772–1779, Jan 2001.
- [134] W. Brumfitt, M. R. J. Salton, and J. M. T. Hamilton-Miller. Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother*, 50(5):731–734, Nov 2002.
- [135] H. Brötz, M. Josten, I. Wiedemann, U. Schneider, F. Götz, G. Bierbaum, and H.-G. Sahl. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol Microbiol*, 30(2):317–327, Oct 1998.
-

-
- [136] K. Christ, I. Wiedemann, U. Bakowsky, H.-G. Sahl, and G. Bendas. The role of lipid II in membrane binding of and pore formation by nisin analyzed by two combined biosensor techniques. *Biochim Biophys Acta*, 1768(3):694–704, Mar 2007.
- [137] H. E. Hasper, N. E. Kramer, J. L. Smith, J. D. Hillman, C. Zachariah, O. P. Kuipers, B. de Kruijff, and E. Breukink. An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science*, 313(5793):1636–1637, Sep 2006.
- [138] A. J. Hyde, J. Parisot, A. McNichol, and B. B. Bonev. Nisin-induced changes in *Bacillus* morphology suggest a paradigm of antibiotic action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(52):19896–19901, Dec 2006.
- [139] B. B. Bonev, E. Breukink, E. Swiezewska, B. De Kruijff, and A. Watts. Targeting extracellular pyrophosphates underpins the high selectivity of nisin. *FASEB J*, 18(15):1862–1869, Dec 2004.
- [140] H. E. van Heusden, B. de Kruijff, and E. Breukink. Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin. *Biochemistry*, 41(40):12171–12178, Oct 2002.
- [141] C. van Kraaij, E. Breukink, M. A. Noordermeer, R. A. Demel, R. J. Siezen, O. P. Kuipers, and B. de Kruijff. Pore formation by nisin involves translocation of its C-terminal part across the membrane. *Biochemistry*, 37(46):16033–16040, Nov 1998.
- [142] H. E. Hasper, B. de Kruijff, and E. Breukink. Assembly and stability of nisin-lipid II pores. *Biochemistry*, 43(36):11567–11575, Sep 2004.
- [143] J. C. Slootweg, S. van der Wal, H. C. Quarles van Ufford, E. Breukink, R. M. J. Liskamp, and D. T. S. Rijkers. Synthesis, antimicrobial activity, and membrane permeabilizing properties of C-terminally modified nisin conjugates accessed by CuAAC. *Bioconjug Chem*, 24(12):2058–2066, Dec 2013.
- [144] E. Breukink, H. E. van Heusden, P. J. Vollmerhaus, E. Swiezewska, L. Brunner, S. Walker, A. J. R. Heck, and B. de Kruijff. Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *J Biol Chem*, 278(22):19898–19903, May 2003.
- [145] E. Kuru, H. V. Hughes, P. J. Brown, E. Hall, S. Tekkam, F. Cava, M. I. A. de Pedro, Y. V. Brun, and M. S. VanNieuwenhze. In situ probing of newly synthesized peptidoglycan in live bacteria with fluorescent D-amino acids. *Angew Chem Int Ed Engl*, 51(50):12519–12523, Dec 2012.
- [146] I. Wiedemann, R. Benz, and H.-G. Sahl. Lipid II-mediated pore formation by the peptide antibiotic nisin: a black lipid membrane study. *J Bacteriol*, 186(10):3259–3261, May 2004.
- [147] B. L. Roth, M. Poot, S. T. Yue, and P. J. Millard. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Appl Environ Microbiol*, 63(6):2421–2431, Jun 1997.
- [148] S.-T. D. Hsu, E. Breukink, E. Tischenko, M. A. G. Lutters, Ben de Kruijff, R. Kaptein, A. M. J. J. Bonvin, and N. A. J. van Nuland. The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nat Struct Mol Biol*, 11(10):963–967, Oct 2004.
- [149] N. E. Kramer, E. J. Smid, J. Kok, B. de Kruijff, O. P. Kuipers, and E. Breukink. Resistance of Gram-positive bacteria to nisin is not determined by Lipid II levels. *FEMS microbiology letters*, 239(1):157–161, 2004.
- [150] W. M. De Vos, J. W. Mulders, R. J. Siezen, J. Hugenholtz, and O. P. Kuipers. Properties of nisin Z and distribution of its gene, *nisZ*, in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 59(1):213–218, 1993.
- [151] J.-H. Spille. *Three-dimensional single particle tracking in a light sheet microscope*. PhD thesis, Universitäts-und Landesbibliothek Bonn, 2014.
- [152] J. G. Ritter, R. Veith, A. Veenendaal, J.-P. Siebrasse, and U. Kubitscheck. Light sheet microscopy for single molecule tracking in living tissue. *PLoS One*, 5(7):e11639, 2010.
- [153] J. G. Ritter. *Single molecule tracking with light sheet microscopy*. PhD thesis, Universitäts-und
-

- Landesbibliothek Bonn, 2011.
- [154] N. Kučerka, M.-P. Nieh, and J. Katsaras. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature. *Biochim Biophys Acta*, 1808(11):2761–2771, Nov 2011.
- [155] W. M. Haynes. *CRC handbook of chemistry and physics*. CRC press, 2012.
- [156] D. C. Koch, T. H. Schmidt, H.-G. Sahl, U. Kubitscheck, and C. Kandt. Structural dynamics of the cell wall precursor lipid II in the presence and absence of the lantibiotic nisin. *Biochim Biophys Acta*, Aug 2014.
- [157] Eckard Specht. The best known packings of equal circles in a circle (complete up to $n = 2600$). <http://hydra.nat.uni-magdeburg.de/packing/cci/>, August 2014.
- [158] C. Tribet and F. Vial. Flexible macromolecules attached to lipid bilayers: impact on fluidity, curvature, permeability and stability of the membranes. *Soft Matter*, 4(1):68–81, 2008.
- [159] N. W. Schmidt, A. Mishra, G. H. Lai, M. Davis, L. K. Sanders, D. Tran, A. Garcia, K. P. Tai, P. B. McCray, A. J. Ouellette, M. E. Selsted, and G. C L. Wong. Criterion for amino acid composition of defensins and antimicrobial peptides based on geometry of membrane destabilization. *J Am Chem Soc*, 133(17):6720–6727, May 2011.
- [160] M. Tschödrich-Rotter, U. Kubitscheck, G. Ugochukwu, J. T. Buckley, and R. Peters. Optical single-channel analysis of the aerolysin pore in erythrocyte membranes. *Biophys J*, 70(2):723–732, Feb 1996.
- [161] R. A. Daniel and J. Errington. Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell*, 113(6):767–776, Jun 2003.
- [162] S. S. Lehrer. Intramolecular pyrene excimer fluorescence: a probe of proximity and protein conformational change. *Methods Enzymol*, 278:286–295, 1997.
- [163] L. Kristanc, S. Svetina, and G. Gomišček. Effects of the pore-forming agent nystatin on giant phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 1818(3):636–644, Mar 2012.
- [164] U. Seifert, K. Berndl, and R. Lipowsky. Shape transformations of vesicles: Phase diagram for spontaneous-curvature and bilayer-coupling models. *Phys Rev A*, 44(2):1182–1202, Jul 1991.
- [165] Y. Yamashita, S. Md. Masum, T. Tanaka, and M. Yamazaki. Shape changes of giant unilamellar vesicles of phosphatidylcholine induced by a de novo designed peptide interacting with their membrane interface. *Langmuir*, 18(25):9638–9641, 2002.
- [166] Y. Tamba and M. Yamazaki. Single giant unilamellar vesicle method reveals effect of antimicrobial peptide magainin 2 on membrane permeability. *Biochemistry*, 44(48):15823–15833, Dec 2005.
- [167] Y. Shai. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta*, 1462(1-2):55–70, Dec 1999.
- [168] A. Zemel, A. Ben-Shaul, and S. May. Modulation of the spontaneous curvature and bending rigidity of lipid membranes by interfacially adsorbed amphipathic peptides. *J Phys Chem B*, 112(23):6988–6996, Jun 2008.
- [169] R. Lipowsky. Spontaneous tubulation of membranes and vesicles reveals membrane tension generated by spontaneous curvature. *Faraday Discuss*, 161:305–31; discussion 419–59, 2013.
- [170] C. Taupin, M. Dvolaitzky, and C. Sauterey. Osmotic pressure induced pores in phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 14(21):4771–4775, Oct 1975.
- [171] H. W. Huang, F.-Y. Chen, and M.-T. Lee. Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes. *Phys Rev Lett*, 92(19):198304, May 2004.
-

- [172] G. Schwarz and C. H. Robert. Kinetics of pore-mediated release of marker molecules from liposomes or cells. Biophys Chem, 42(3):291–296, Apr 1992.
 - [173] S. Y. Noskov, W. Im, and B. Roux. Ion permeation through the alpha-hemolysin channel: theoretical studies based on Brownian dynamics and Poisson-Nernst-Planck electrodiffusion theory. Biophys J, 87(4):2299–2309, Oct 2004.
 - [174] M.-T. Lee, W.-C. Hung, F.-Y. Chen, and H. W. Huang. Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides. Proc Natl Acad Sci U S A, 105(13):5087–5092, Apr 2008.
 - [175] O. P. Kuipers, H. S. Rollema, W. M. Yap, H. J. Boot, R. J. Siezen, and W. M. de Vos. Engineering dehydrated amino acid residues in the antimicrobial peptide nisin. J Biol Chem, 267(34):24340–24346, Dec 1992.
 - [176] R. R. Bonelli, T. Schneider, H.-G. Sahl, and I. Wiedemann. Insights into in vivo activities of lantibiotics from gallidermin and epidermin mode-of-action studies. Antimicrob Agents Chemother, 50(4):1449–1457, Apr 2006.
 - [177] T. Schneider, M. M. Senn, B. Berger-Bächi, A. Tossi, H.-G. Sahl, and I. Wiedemann. In vitro assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol, 53(2):675–685, Jul 2004.
 - [178] G. Rouser, S. Fkeischer, and A. Yamamoto. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. Lipids, 5(5):494–496, May 1970.
 - [179] U. Kohlrausch and J. V. Höltje. One-step purification procedure for UDP-N-acetylmuramyl-peptide murein precursors from *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol Lett, 62(2-3):253–257, Mar 1991.
 - [180] M. J. Hope, M. B. Bally, G. Webb, and P. R. Cullis. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. Biochim Biophys Acta, 812(1):55–65, Jan 1985.
 - [181] A. Veenendaal. Untersuchung der Dynamik von Transportrezeptoren an der Kernpore mittels kontrastverstärkter Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie. PhD thesis, Universitäts- und Landesbibliothek Bonn, 2013.
 - [182] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods, 9(7):671–675, Jul 2012.
 - [183] U. Kubitscheck, O. Kückmann, T. Kues, and R. Peters. Imaging and tracking of single GFP molecules in solution. Biophys J, 78(4):2170–2179, Apr 2000.
 - [184] K. I. Mortensen, L. S. Churchman, J. A. Spudich, and H. Flyvbjerg. Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy. Nat Methods, 7(5):377–381, May 2010.
 - [185] H. Deschout, K. Neyts, and K. Braeckmans. The influence of movement on the localization precision of sub-resolution particles in fluorescence microscopy. J Biophotonics, 5(1):97–109, Jan 2012.
 - [186] C. M. Anderson, G. N. Georgiou, I. E. Morrison, G. V. Stevenson, and R. J. Cherry. Tracking of cell surface receptors by fluorescence digital imaging microscopy using a charge-coupled device camera. Low-density lipoprotein and influenza virus receptor mobility at 4 degrees C. J Cell Sci, 101 (Pt 2):415–425, Feb 1992.
 - [187] G. J. Schütz, H. Schindler, and T. Schmidt. Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion. Biophys J, 73(2):1073–1080, Aug 1997.
-

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schemata der Lipiddoppelschicht und der biologischen Membran	2
1.2	Zellmembran und -wand von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien	5
1.3	Schema des Zellwandbiosynthesezyklus in <i>S. aureus</i>	7
1.4	Struktur und Präparation von Modellmembransystemen	8
1.5	Experimentelle Verwendung von unilamellaren Riesenvesikeln	11
1.6	Dynamische Prozesse in der Lipiddoppelschicht	13
1.7	Theoretische Modelle für die laterale Membrandiffusion	16
1.8	Laterales Druckprofil und intrinsische Krümmung	17
1.9	Schema der Partikeladsorption an Lipiddoppelschichten	18
1.10	Taxonomie antimikrobieller Peptide	21
1.11	Wirkmechanismen von antimikrobiellen Peptiden	23
1.12	Bindungsstellen von Biosynthese-selektiven Antibiotika	24
1.13	Strukturmerkmale antimikrobieller Peptide	26
1.14	Effekte der Peptidadsorption	28
1.15	Schematische Struktur von Nisin	29
1.16	Fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>B. subtilis</i> unter Wirkung von Nisin	31
2.1	Carboxyfluorescein-Ausströmungsexperiment	37
2.2	Biologische Relevanz von großen Nisinaggregaten	39
2.3	Korrelation von Aggregation und Permeation <i>in vivo</i>	40
2.4	Strukturen von DOPC und DOPG	41
2.5	Lipidstrukturen der Baktopenolkomponenten	42
2.6	Ladungsinduzierte Bindung von Nisin an Phospholipidvesikel	43
2.7	Aggregation von Lipid II-Atto488 und Nisin-AF647	44
2.8	Spezifische Wechselwirkungen von Nisin mit Lipid II	45
2.9	Spezifische Wechselwirkungen von Nisin mit C ₅₅ -P, C ₅₅ -PP und Lipid I	45
2.10	Analyse der Membranintensitätsprofile	47
2.11	Mittlere Aggregatintensitäten und -dichten	48
2.12	Schema der Lichtblattfluoreszenzmikroskopie	50
2.13	Struktur von POPC	51

2.14	Lichtblattfluoreszenzmikroskopie an GUVs	51
2.15	Einzelmolekülsignal von Lipid II-Atto647	52
2.16	Einzelmolekültrajektorie von Lipid II-Atto647	52
2.17	MSD-Kurven von Lipid II-Atto647 nach Nisinzugabe	54
2.18	Filterkriterien für Diffusionskoeffizienten einzelner Trajektorien	55
2.19	Verteilung der Diffusionskoeffizienten	56
2.20	Beispieltrajektorien für D_1 , D_2 und D_3	58
2.21	Zeitabhängige Fraktionen A_i von D_1 , D_2 und D_3	59
2.22	Sprungweitenverteilungen	60
2.23	Anpassungskurven für die Berechnung der POPE- und Lipid II-Diffusion	62
2.24	Problem der dichtesten Kreispackung	64
2.25	Vesikelabschnürung	66
2.26	Formumwandlung und Membrankollaps	68
2.27	Konfokale Aufnahme eines GUV-Kollaps	69
2.28	Permeationsaktivität von Nisin für unterschiedliche Baktoprenolbindungspartner	71
2.29	Konzentrationsabhängige Membranpermeation von Nisin	73
5.1	Markierung von Nisin	92
5.2	Markierung von POPE und Lipid II	94
5.3	Elektroformation	95
5.4	Immobilisierung von Bakterienzellen auf Agarosekissen	98
5.5	Justierung des Lichtblatts	100
5.6	Trajektorienbildung	104
5.7	Trajektorienanalyse	105
5.8	Bestimmung der Vesikelgröße	108
5.9	Intensitätsbestimmung an <i>B. subtilis</i>	108

Tabellenverzeichnis

1.1	Phospholipidzusammensetzung verschiedener Zellmembranen	4
2.1	Mobilität von Lipid II-Atto647-Molekülen nach Nisinzugabe	54
2.2	Mobilität von POPE-Atto647 und Lipid-Atto647	63
6.1	Liste der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe	109
6.2	Liste der verwendeten Lipide	110
6.3	Liste der Lösungsmittel	110
6.4	Liste der Reagenzien	111
6.5	Liste der verwendeten Bakterienstämme	111
6.6	Liste der Zubehöerteile zur Elektroformation	112
6.7	Liste des Zubehörs zur Vesikelpräparation	113
6.8	Liste der Probenkammern	113

Abkürzungsverzeichnis

AF546	Alexa Fluor 546
AF647	Alexa Fluor 647
C₅₅-P	Undecaprenylphosphat
C₅₅-PP	Undecaprenyldiphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPG	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
EMCCD	electron-multiplying charge-coupled device
GUV	Giant unilamellar vesicle
LY	Lucifer Yellow
MHK	Minimale Hemmkonzentration
NHS-Ester	N-Hydroxysuccinimid-Ester
PC	Phosphocholin
PE	Phosphoethanolamin
PG	Phosphoglycerol
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
POPE	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
SRV	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SUV	Small unilamellar vesicle

Liste wissenschaftlicher Beiträge

Zeitschriftenbeiträge

1. *Aggregates of nisin with various bactoprenol-containing cell wall precursors differ in size and membrane permeation capacity*
K. Scherer, I. Wiedemann, C. Ciobanasu, H.-G. Sahl, U. Kubitscheck
Biochim. Biophys. Acta 2013, 1828, 2628-2636.
2. *Extended, sensitive and fast 3D-tracking of single molecules and RNA particles in living tissue*
J.-H. Spille, T. Kaminski, K. Scherer, J. S. Rinne, A. Heckel, U. Kubitscheck
Nucleic Acids Res. 2014, pii: gku1194.
3. *The lantibiotic nisin induces formation of large Lipid II aggregates causing membrane instability and vesicle budding*
K. M. Scherer, J.-H. Spille, F. Grein, H.-G. Sahl, U. Kubitscheck
Biophys. J., *accepted*

Vorträge

1. K. Scherer, C. Ciobanasu, K. Lohner, U. Kubitscheck 02.2010
Dynamics of single LL-37 peptides on model membranes
Iberian Peptide Meeting, Lissabon, Portugal
 2. K. Scherer, S. Brück, C. Ciobanasu, U. Kubitscheck 06.2010
Dynamik von bioaktiven Peptiden an Modellmembranen
Workshop für Doktoranden des Sonderforschungsbereichs 624, Bad Honnef, Deutschland
 3. K. Scherer, I. Wiedemann, U. Kubitscheck 06.2012
The antimicrobial peptide nisin targets bacterial cell wall components
EBSA Biophysics Course on 'Membrane Biophysics & Lipid/Protein Interaction',
Lacanau, Frankreich
-

Poster

1. K. Scherer, J.-P. Siebrasse, U. Kubitscheck 04.2009
Visualization of the intra-NPC dynamics of the nucleoporins Nup153 and Nup214 using SNAP-tag technology
'Focus on Microscopy', Krakau, Polen
 2. C. Ciobanasu, K. Scherer, U. Kubitscheck 04.2010
Peptide-membrane interactions analyzed by single-molecule and confocal microscopy
WE-Heraeus Seminar on 'Biophysics of Membrane-active Peptides', Bad Honnef, Deutschland
 3. K. Scherer, C. Ciobanasu, S. Brück, U. Kubitscheck 10.2010
Dynamics of single bioactive peptides on model membranes
Annual Meeting of the German Biophysical Society, Bochum, Deutschland
 4. K. Scherer, C. Wallner, C. Ciobanasu, K. Lohner, I. Wiedemann, U. Kubitscheck 04/2011
Imaging bioactive peptides with model membranes
'Focus on Microscopy', Konstanz, Deutschland
 5. K. Scherer, I. Wiedemann, C. Ciobanasu, H.-G. Sahl, U. Kubitscheck 02.2012
Fluorescence microscopy of nisin binding to bactoprenol bound cell wall precursors
Annual Meeting of the Biophysical Society, San Diego, CA, USA
 6. K. Scherer, I. Wiedemann, C. Ciobanasu, H.-G. Sahl, U. Kubitscheck 05.2013
Aggregates of nisin with various bactoprenol-containing cell wall precursors differ in size and membrane permeation capacity
International Symposium Sonderforschungsbereich 624, Bonn, Deutschland
 7. K. Scherer, J.-H. Spille, F. Grein, H.-G. Sahl, U. Kubitscheck 06.2014
Membrane integrity is disturbed by progressive nisin-Lipid II aggregation
International Symposium on Antimicrobial Peptides, Lorient, Frankreich
 8. K. Scherer, J.-H. Spille, F. Grein, H.-G. Sahl, U. Kubitscheck 06.2014
Membrane integrity is disturbed by progressive nisin-Lipid II aggregation
Gordon Research Conference 'Bacterial Cell Surfaces', West Dover, VT, USA
-

Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Ulrich Kubitscheck für die Möglichkeit, an einem spannenden und fordernden Thema arbeiten zu dürfen, für seine stets offene Tür ebenso wie für die Freiheiten bei der Bearbeitung der Fragestellung sowie die Möglichkeit im Laufe meiner Promotion an vielen spannenden Konferenzen und Workshops im In- und Ausland teilnehmen zu dürfen.

Prof. Dr. Hans-Georg Sahl danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Prof. Sahl bin ich im Besonderen dankbar für alle Anregungen, die ich bei Gesprächen und Treffen im Rahmen der Kooperation von ihm erhalten habe. Er hat mich motiviert, mein Forschungsinteresse auf die Mikrobiologie zu erweitern.

Prof. Dr. Rudolf Merkel und Prof. Dr. Hanns Häberlein danke ich für die umgehende, freundliche Bereitschaft, in der Prüfungskommission mitzuwirken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Kollegen Dr. Jan-Hendrik Spille. Mit seiner fachlich immer sehr kompetenten Unterstützung bei Mikroskopie und Datenanalyse hat er mir mit Geduld und Gelassenheit bei der Umsetzung meiner Ideen sehr geholfen. Trotz aller eigenen Projekte hat er sich immer Zeit genommen, meine technischen Fragen mit mir zu diskutieren.

Dr. Imke Wiedemann danke ich für die Anregung meines Promotionsprojektes und die Bereitstellung von fluoreszenzmarkiertem Nisin. Bei Dr. Fabian Grein möchte ich mich für die Bereitstellung von fluoreszenzmarkiertem Lipid II bedanken und für die hilfreichen, fachlichen Diskussionen.

Meinen Bürokollegen Claudio Nietzel und Lisa Büttner danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit und ihre Hilfsbereitschaft bei der Laborarbeit und Lehrtätigkeit.

Meinen ehemaligen Kollegen Dr. Jörg Ritter und Dr. Andreas Veenendaal danke ich für die freundschaftliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Hilfe bei vielen Fragestellungen, was mir besonders am Anfang geholfen hat.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Biophysikalische Chemie danke ich für die unkomplizierte und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Dem Cusanuswerk danke ich für die finanzielle und ideelle Förderung und dem Cusanuswerk, dem Böhringer Ingelheim Fonds sowie dem DAAD für die Förderung weltweiter Konferenzbesuche.

Zum Schluss ist es mir ein besonderes Anliegen, meinen Eltern zu danken. Es hat mir sehr geholfen, dass sie mir immer Rückhalt waren und ich mich auf ihre Unterstützung stets verlassen konnte.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit persönlich, selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe, sowie direkt oder indirekt übernommene Daten und Konzepte unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht habe. Ich habe keine früheren Promotionsversuche unternommen und die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Für die Erstellung der vorgelegten Arbeit und/oder die Gelegenheit zur Promotion habe ich keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen.

Bonn, den 12.02.2015

Katharina Maria Scherer
